

Immunologische Grundlagen für den Schutz vor simianem AIDS in den natürlichen Wirten von SIV

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Ing. Christine Siegismund

geboren am 15.03.1980 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Markschies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. rer. nat., habil. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. D.H. Krüger

2. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Kurth

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.09

Meinen Eltern

Danksagung

Herrn Professor Dr. R. Kurth danke ich für die fachliche Betreuung meiner Arbeit sowie für die wertvollen Anregungen und die stets gewährte Unterstützung.

Für die Vertretung der Arbeit gegenüber der Fakultät danke ich Herrn Professor Dr. D. H. Krüger.

Besonders danke ich Herrn Dr. Stephen Norley für die Überlassung des Themas, die wertvolle Anleitung zu selbständiger wissenschaftlicher Arbeit, für sein Engagement bezüglich meiner Arbeit und die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes.

Spezieller Dank gilt dem „Primaten-Team“ für die interessante, spannende und harmonische Zusammenarbeit sowie die daraus erst mögliche Durchführbarkeit dieses großen Versuchs: Verena Dolata, Dr. Oliver „Fox“ Hohn, Sandra Kühn, Nicole Norley und Dr. Stephen Norley.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit bei folgenden Mitarbeitern des Paul-Ehrlich- und des Robert Koch-Instituts bedanken:

Paul-Ehrlich-Institut:

Dr. Cheick Coulibaly, Dr. Roland Plesker, Julia Seidl sowie allen TierpflegerInnen.

Robert Koch-Institut:

Bachtijor Asomuddinov, Dr. Norbert Bannert, Nadine Beimforde, Christiane Bug, Karin Braummüller, Verena Dolata, Dr. Uwe Fiebig, Marion Haag, Kirsten Hanke, Dr. Oliver "Fox" Hohn, Mathias Knauf, Sandra Kühn, Jutta Masopust, Nicole Norley, Dr. Isaac Sipo, Judith Wildner, Simone Zumkowski sowie allen TierpflegerInnen.

Für die Hilfe beim Verfassen und bei der Korrektur dieser Dissertation möchte ich mich besonders bei Dr. Oliver „Fox“ Hohn und Kirsten Hanke sowie Mathias Knauf und Judith Wildner bedanken. Die schöne Zeit wird mir unvergesslich bleiben.

Schließlich möchte ich meiner Familie großen Dank für ihre Liebe, vielfältige Unterstützung und immerwährende Motivation aussprechen.

Zusammenfassung

Das Humane Immundefizienzvirus (HIV) ist der Erreger von AIDS und als Zoonose von den Schimpansen (HIV-1) bzw. den Rauchmangaben (HIV-2) auf die menschliche Population übergesprungen. Diese Primatenspezies sind die natürlichen Wirte für die simianen verwandten Viren SIVcpz bzw. SIVsm. Die nicht-natürlichen Virus-Wirt-Beziehungen der Immundefizienzviren resultieren in einem pathogenen Verlauf, wie HIV im Menschen und SIVmac in Rhesusmakaken. Die natürlichen Wirte Rauchmangaben, Schimpansen, Afrikanische Grüne Meerkatzen (AGM) und viele mehr entwickeln hingegen kein simianes AIDS. Dies erfolgt trotz lebenslanger Infektion mit SIV und einer zur HIV-Infektion im Menschen äquivalenten Viruslast. Die natürlichen Wirte weisen darüber hinaus keine Immunantwort gegen das virale Kernprotein Gag (gruppen-spezifisches Antigen) auf, was ein früh und zahlreich gebildetes Protein während der Virusreplikation ist. Die fehlende humorale Immunantwort könnte die natürlichen Wirte vor Aktivierung des Immunsystems und dadurch auch vor sAIDS bewahren. Frühere Versuche in AGM mit injiziertem SIVagmGag-Protein zeigten zwar, dass die Induktion einer humoralen Immunantwort gegen SIVagmGag möglich ist, diese aber schon nach kurzer Zeit wieder absinkt. Des Weiteren bildete sich durch Infektion mit SIVagm in den Tieren keine anamnestiche Immunantwort heraus, die für die Erkennung von gleichen Epitopen maßgeblich ist. Es scheint ein Unterschied in der Erkennung von exogenem injiziertem SIVagmGag-Protein zu endogenem, durch das Virus selbst gebildetem, Protein in den AGM zu bestehen. Folglich wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Immunisierung mit SIVagmGag-DNA unter Umgehung des Unterschieds in der Proteinprozessierung eine anamnestiche Immunantwort in den AGM induziert.

Um diese Hypothese zu testen und die Gag-Immunreaktion in Abwesenheit anderer viraler Gene bezüglich der Pathogenität zu evaluieren, wurden codonoptimierte SIVagmGag- und SIVmacGag-DNA Immunisierungsvektoren generiert. Die Proteinexpression wurde *in vitro* und die Immunogenität in Balb/c und C57Bl/6 Mäusen getestet. Jeweils eine Gruppe von vier AGM erhielt bioballistisch SIVagmGag-DNA bzw. SIVmacGag-DNA. Als Kontrollen dienten mit codonoptimierter DNA immunisierte Rhesusmakaken sowie mit Leervektor immunisierte Primaten beider Spezies. Als Kostimulanz wurde zusätzlich jeweils speziesspezifische *gmcsf* DNA verwendet.

Im Gegensatz zu den Rhesusmakaken konnte in den AGM durch DNA-Immunisierung keine zelluläre und nur eine schwache, transiente humorale anamnestiche Immunantwort nach Infektion induziert werden, obwohl beide Gag-Proteine endogen produziert wurden. Daher kann die fehlende anamnestiche Immunantwort der AGM nach Immunisierung mit Gag-Protein vermutlich nicht auf Unterschiede in der Proteinprozessierung und -erkennung (endogen versus exogen) zurückgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Studie deuten an, dass während der

Infektion dieses natürlichen Wirtes eine aktive Unterdrückung der anti-Gag-Antikörperantwort stattfindet, möglicherweise induziert durch eine Anergie in Gag-spezifischen T-Helferzellen.

Schlagwörter: SIV, AGM, Immunantwort, DNA-Immunisierung, Gag, CTL Epitope

Abstract

The causative agents of AIDS, the human immunodeficiency viruses (HIV-1 and HIV-2), were transmitted zoonotically to the human population from the natural hosts of the related simian immunodeficiency viruses SIVcpz (chimpanzees) and SIVsm (sooty mangabeys), respectively. In contrast to the outcome of infections in non-natural hosts (e.g. HIV in humans, SIVmac in rhesus macaques), the natural hosts of SIV do not develop simian AIDS-like symptoms despite life-long infection with virus loads matching those seen in HIV-infected humans. Many such natural host primates infected with SIV, such as SIVagm-infected African green monkeys (AGMs), fail to mount an antibody response to the intact viral core protein Gag (group-specific antigen), a protein produced extensively during infection. It has been postulated that this lack of an immune response to Gag could protect the natural hosts from immunopathological effects and therefore from simian AIDS. Previous studies in AGMs indicated that Gag protein produced endogenously during infection is 'seen' by the immune system differently than that introduced exogenously by protein immunisation, possibly through differences in processing or through specific tolerance at the T-cell level.

To address these possibilities, primate studies were performed in which the responses in the natural and non-natural hosts to endogenously produced Gag protein in the absence of other viral genes were compared and the influence of such endogenous priming on the immune response to infection was evaluated. This was achieved by bioballistic immunisation of AGMs and rhesus macaques with codon-optimised DNA coding for SIVagm or SIVmac Gag protein delivered together with DNA coding for the species-specific GM-CSF cytokine. Prior to the primate studies, the DNA constructs were evaluated in BALB/c and C57Bl/6 mice for immunogenicity and protein expression.

In contrast to the rhesus macaques, SIVagmGag DNA immunisation of African green monkeys generally failed to prime for an anamnestic cellular immune response and primed for only a weak, transient anamnestic humoral response to the protein upon infection, despite the proteins resulting from both immunisation and infection being produced endogenously. Differences in protein processing and recognition (endogenous versus exogenous) do not therefore appear to account for the lack of priming for an anamnestic immune response seen using a protein immunogen. Rather, the results seem to indicate that an active suppression of the anti-Gag immune response may occur during infection of this natural host of SIV, possibly by the induction of anergy in Gag-specific Th cells.

Keywords: SIV, AGM, Immune response, DNA immunisation, Gag, CTL epitopes

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG.....	I
ZUSAMMENFASSUNG	II
ABSTRACT.....	IV
INHALTSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 AIDS UND DESSEN ERREGER HIV	1
1.1.1 Entdeckung, Krankheitsbild und Therapeutika	2
1.1.2 Phylogenetik der Primaten-Lentiviren	4
1.1.3 HIV-Morphologie und Genomstruktur.....	6
1.1.4 Replikationszyklus	8
1.1.5 Natürliche Inhibitoren gegen HIV	9
1.2 IMMUNOLOGIE: HUMORALE UND ZELLULÄRE IMMUNANTWORT.....	10
1.2.1 Humorale Immunantwort	10
1.2.2 Zelluläre Immunantwort.....	12
1.2.3 Haplotyp und MHC-Molekül	14
1.2.4 Pathogenese der HIV/SIV Infektion.....	16
1.3 IMPFSTOFFSTRATEGIE GEGEN HIV	18
1.3.1 Das Modellsystem SIV im Tier.....	18
1.3.2 Entwicklung von AIDS Impfstoffen	19
1.3.3 Codonoptimierung von Genen	22
1.3.4 Gene Gun Immunisierung	23
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
2.1.1 Codonoptimierung der Gene SIVagmGag und SIVmacGag.....	25
2.1.1.1 Codon-Gebrauch der Säugetiere	25
2.1.1.2 Fusion der einzelnen Oligonukleotide mittels PCR	25
2.1.2 Quantifizierung von DNA/RNA	27
2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese	27
2.1.4 Bakterien-Screen mittels Kolonie-PCR.....	27

2.1.5	Plasmid-Isolierung in kleinem und großem Maßstab.....	28
2.1.6	Sequenzier-PCR	28
2.1.7	Zielgerichtete Mutagenese-PCR.....	29
2.1.7.1	FlipFlop®-Mutagenese	29
2.1.7.2	Mutagenese nach Stratagene	30
2.1.8	Klonierung in den Immunisierungsvektor pTH.....	31
2.1.9	Isolierung von mRNA aus agmPBMC zur Klonierung von <i>gmcsf</i>	32
2.1.10	One-step Reverse Transkriptase-PCR (OneStep RT-PCR)	32
2.1.11	TOPO®-Klonierung	33
2.1.12	Isolierung viraler RNA aus Plasma	33
2.1.13	Isolierung genomischer DNA aus PBMC.....	34
2.1.14	Bestimmung der Plasma- und Proviruslast mittels realtime-PCR	34
2.1.15	Genotypisierungs-PCR	36
2.2	BESCHICHTUNG DER SCHLÄUCHE - HERSTELLUNG DER GENE GUN-MUNITION.....	36
2.3	IMMUNISIERUNG DER MÄUSE.....	37
2.3.1	Tiere	37
2.3.2	Immunisierungsstrategie und -schema	37
2.4	IMMUNISIERUNG UND BELASTUNG DER PRIMATEN.....	38
2.4.1	Tiere	38
2.4.2	Immunisierungsstrategie und -schema.....	39
2.4.3	Belastung mit SIVagm bzw. SIVmac239.....	40
2.5	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	41
2.5.1	Zellen und Medien	41
2.5.2	Lymphozytenseparation, Plasma- und Serumisolierung	41
2.5.3	Vitalfärbung	42
2.5.4	Milzzellisolation und Serumgewinn.....	43
2.5.5	Transfektion	43
2.6	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	44
2.6.1	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.6.2	Westernblot	45
2.7	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	45
2.7.1	Nachweis von SIV-spezifischen Antikörpern: SIVagm- / SIVmac-ELISA	45
2.7.2	INF γ - ELISpot.....	47
2.8	MATERIALIEN UND GERÄTE.....	49
2.8.1	Geräte	49
2.8.2	Puffer, Medien und Lösungen	49
2.8.3	Herkunft der Plasmide.....	50
2.8.4	Peptide.....	51
3	ERGEBNISSE.....	52
3.1	HERSTELLUNG DER GENE SIVAGMGAG UND SIVMACGAG.....	52
3.1.1	Codonoptimierung der Gene SIVagmGag und SIVmacGag.....	52

3.1.2	Vergleich der Expressionsstärke von CO- und WT-Sequenz <i>in vitro</i>	53
3.2	DNA-IMMUNISIERUNG IM MAUS-MODELL	53
3.2.1	Vergleich der Immunogenität von CO- und WT-Sequenz <i>in vivo</i>	53
3.2.2	Notwendigkeit für die Koapplikation von murinem GMCSF	56
3.2.3	Epitopkartierung von SIVagmGag und SIVmacGag in Balb/c- und C57Bl/6-Mäusen	57
3.2.4	Feinkartierung von CTL-Epitopen	60
3.3	DNA-IMMUNISIERUNG IM PRIMATEN-MODELL.....	62
3.3.1	Konstruktion der Immunmodulatoren <i>gmcsf</i> für den Primatenterversuch	62
3.3.2	Applikation der Immunisierungs-DNA bei den Primaten	64
3.3.3	Antikörpertiter im Verlauf der Studie	65
3.3.3.1	Gesamt-AK-Immunantwort bis zur 4. Wochen nach Infektion.....	66
3.3.3.2	antiGag-Antikörpertiter.....	68
3.3.3.3	antiOvalbumin-Antikörpertiter	72
3.3.4	Detektion spezifischer T-Zellen	73
3.3.4.1	Darstellung der spezifischen T-Zellen im Verlauf der Studie am Beispiel AGM 2 und Rh 14.....	74
3.3.4.2	Darstellung spezifischer T-Zellen total	75
3.3.5	Kartierung der CTL-Epitope in AGM und Rhesusaffen	78
3.3.6	Reaktion der T-Zellen auf das Gag-Protein des Belastungsvirus	80
3.3.7	Feinkartierung von MHC-I-Epitopen in AGM und Rhesusmakaken	82
3.3.8	Plasmaviruslast im Verlauf der Studie	83
3.3.9	Proviruslast im Verlauf der Studie	85
3.3.10	Genotypisierung des Rh 15 mittels PCR	87
3.3.11	Physische Reaktionen der Tiere auf die durchgeführte Studie	88
3.3.12	Maus- und Primaten-Studien im Überblick	88
4	DISKUSSION.....	90
4.1	DNA-IMMUNISIERUNG IM MAUS-MODELL	91
4.2	DNA-IMMUNISIERUNG IM PRIMATEN-MODELL.....	93
	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
	ANHANG I: OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE CODON-OPTIMIERUNG.....	117
	ANHANG II: 15MER SIVAGMGAG-PEPTIDE	121
	ANHANG III: 15MER SIVMACGAG-PEPTIDE	122
	ANHANG IV: 15MER HIV-1GAG-PEPTIDE	124
	ANHANG V: MATRIXFORMAT DER PEPTIDPOOLS MIT DEN EINZELPEPTIDEN.....	126
	ANHANG VI: 12-16MER OVA-PEPTIDE	127
	ANHANG VII: ALIGNMENT SIVAGM3	128

ANHANG VIII: ALIGNMENT SIVMAC23	130
ANHANG IX: VEKTORKARTE.....	132
ANHANG X: LAGE DER KARTIERTEN MHC-EPITOPE.....	133
PUBLIKATIONSLISTE	134
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	135

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: EINIGE DER SIV UND IHRE MÖGLICHKEIT ZUR TRANSMISSION [35, 44, 110, 111, 112, 113]	17
TABELLE 2: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE KOMPONENTEN DER FUSIONS-PCR.....	26
TABELLE 3: CYCLER-PROGRAMM FÜR DIE FUSIONS-PCR	26
TABELLE 4: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE KOMPONENTEN DER KOLONIE-PCR.....	28
TABELLE 5: CYCLER-PROGRAMM FÜR DIE KOLONIE-PCR	28
TABELLE 6: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE KOMPONENTEN DER SEQUENZIER-PCR.....	29
TABELLE 7: CYCLER-PROGRAMM FÜR DIE SEQUENZIER-PCR	29
TABELLE 8: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE KOMPONENTEN DER MUTAGENESE-PCR MITTELS FLIPFLOP®	30
TABELLE 9: CYCLER-PROGRAMM FÜR DIE MUTAGENESE-PCR MITTELS FLIPFLOP®	30
TABELLE 10: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE KOMPONENTEN DER MUTAGENESE-PCR NACH STRATAGENE.....	31
TABELLE 11: CYCLER-PROGRAMM FÜR DIE MUTAGENESE-PCR NACH STRATAGENE	31
TABELLE 12: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE PCR ZUM ANFÜGEN VON SCHNITTSTELLEN	31
TABELLE 13: CYCLER-PROGRAMM FÜR DIE PCR ZUM ANFÜGEN VON SCHNITTSTELLEN	32
TABELLE 14: PIPETTIERSCHEMA FÜR DEN MASTERMIX DER RT-PCR	33
TABELLE 15: CYCLER-PROGRAMM FÜR DIE ONE-STEP RT-PCR	33
TABELLE 16: PIPETTIERSCHEMA FÜR DEN MASTERMIX DER QUANTITATIVEN QUANTIFAST®-RT-PCR	34
TABELLE 17: PIPETTIERSCHEMA FÜR DEN MASTERMIX DER QUANTITATIVEN QUANTIFAST®-PCR.....	35
TABELLE 18: CYCLER-PROGRAMM FÜR DIE QUANTITATIVE QUANTIFAST RT-PCR	35
TABELLE 19: ÜBERSICHT DER PRIMATEN IM VERSUCH	38
TABELLE 20: DNA-MENGE PRO IMMUNISIERUNG	40
TABELLE 21: SDS-GEL-ZUSAMMENSETZUNG: DIE KOMPONENTEN REICHEN FÜR ZWEI GELE.	44
TABELLE 22: VERWENDETE OPTIMALE CODONS FÜR SÄUGETIERE [148]	52
TABELLE 23: MATRIX FÜR DIE POOLS DER EINZELNEN SIVAGM _{VERY} GAG-PEPTIDE, FARBLICH UNTERLEGT SIND DIE JEWEILIG KARTIERTEN 15MERE IN DEN VERSCHIEDENEN MAUSSTÄMMEN.....	57
TABELLE 24: KARTIERTE GAG-PEPTIDE IN BALB/C UND C57BL/6 MÄUSEN, POSITION IM GEN SIEHE AUCH ANHANG VII,VIII UND X	59
TABELLE 25: ÜBERSICHT KARTIERTE EPITOPE IN AGM UND RHESUSMAKAKEN, LAGE DER EPITOPE ANHANG X.....	83

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: GLOBALE VERTEILUNG VON HIV-INFEKTIONEN, PROZENTUAL UND TOTAL 2007	1
ABB. 2: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME: LINKS VON SIV UND RECHTS VON HIV.....	2
ABB. 3: PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM DER PRIMATEN LENTIVIREN.....	5
ABB. 4: SCHEMATISCHE 3D-STRUKTUR VON SIV (DR. S. NORLEY, RKI).....	7
ABB. 5: AUFBAU DES LENTIVIRUS-GENOMS [46].....	7
ABB. 6: FLUCHT VOR DER ANTWORT NEUTRALISIERENDER ANTIKÖRPER (100).....	11
ABB. 7: DIE ANTWORT DES IMMUNSYSTEMS AUF HIV ALS AUSLÖSER FÜR AIDS [93]	13
ABB. 8: BILDUNG EINES T-ZELL-REZEPTOR-MHC-I-KOMPLEXES MIT EINGESCHLOSSENEM VIRALEN PEPTID.....	14
ABB. 9: PHOTOS VERSCHIEDENER PRIMATENSPEZIES IN NATÜRLICHER UMGEBUNG	16
ABB. 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FUSIONIERUNG VON ZUEINANDER KOMPLEMENTÄREN OLIGOMEREN	25
ABB. 11: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER UNTERTEILUNG DES SIVAGM3 <i>GAG</i> -GENES.....	26
ABB. 12: IMMUNISIERUNGSSCHEMA DER BALB/C- UND C57BL/6-MÄUSEN.....	37
ABB. 13: IMMUNISIERUNGSSTRATEGIE	39
ABB. 14: WESTERNBLOT ANALYSE DER TRANSFEKTION VON CHO-ZELLEN MIT SIVAGMGAGWT/CO, SIVMACGAGWT/CO UND HIV-1GAG-WT/CO (OBEN α V5-AK, UNTEN AG3.0-AK SPEZIFISCH FÜR GAG).....	53
ABB. 15: VERGLEICH VON INDUZIERTER ZELLULÄRE IMMUNANTWORT DURCH IMMUNISIERUNG MIT DEM SIVAGMGAGCO (#1-5) BZW. -WT-GEN (#6-10) IN BALB/C MÄUSEN	54
ABB. 16: INDUKTION EINES ANTI-SIVAGMGAG-ANTI-KÖRPERTITER	54
ABB. 17: VERGLEICH VERSCHIEDENER VERABREICHTER DNA-MENGEN INNERHALB DESSELBEN GENS BZW. ZWISCHEN DER CO- UND WT-VARIANTE VON SIVAGMGAG; ZELLULÄRE IMMUNANTWORT IN BALB/C MÄUSEN	55
ABB. 18: VERGLEICH VERSCHIEDENER VERABREICHTER DNA-MENGEN INNERHALB DESSELBEN GENS BZW. ZWISCHEN DER CO- UND WT-VARIANTE VON SIVAGMGAG; HUMORALE IMMUNANTWORT IN BALB/C MÄUSEN	56
ABB. 19: ELISPOT-ASSAY – KARTIERUNG DES SIVAGMGAG EPITOPS IN C57BL/6 MÄUSEN #1-#10 ZWEIFACH MIT SIVAGMGAG-DNA IMMUNISIERTE C57BL/6 MÄUSE	58
ABB. 20: ELISPOT-ASSAY – FEINKARTIERUNG DES HIV-1GAG EPITOPS IN BALB/C MÄUSEN #1-#4 ZWEIFACH MIT HIV-1GAGCO-DNA IMMUNISIERTE BALB/C MÄUSE ROT - 15MER GRÜN - 9MER GELB - UNSPEZ. 9MER.....	59
ABB. 21: ELISPOT-ASSAY - FEINKARTIERUNG DES SIVMACGAG EPITOPS IN C57BL/6 MÄUSEN	60
ABB. 22: ELISPOT-ASSAY - FEINKARTIERUNG DES HIV-1GAG EPITOPS IN BALB/C MÄUSEN #1-#4 ZWEIFACH MIT HIV-1GAGCO-DNA IMMUNISIERTE BALB/C MÄUSE	61
ABB. 23: SEQUENZIERERGEBNISSE DER <i>GMCSF</i> SEQUENZ VON AGM (SCHWARZ DNA-SEQUENZ, GRÜN TRANSLATION IM EINBUCHSTABEN-CODE).....	62
ABB. 24: SEQUENZVERGLEICH VON <i>GMCSF</i> VERSCHIEDENER ALTWELTAFFEN AUF AMINOSÄUREEBENE, ROT EINGERAHMT SIND DIE JEWEILIGEN UNTERSCHIEDE ZUR HUMANEN SEQUENZ.....	63

ABB. 25: WESTERBLOT, GMCSF-EXPRESSION DER SPEZIES AGM, AGM UNTERART VERVET, RHEUSAFFEN UND SCHWEINSAFFEN (α V5-AK)	64
ABB. 26: HAUTREAKTIONEN NACH APPLIKATION DER GOLDPARTIKEL	65
ABB. 27: ANTIKÖRPERTITER GEGEN SIVAGMGAG LANGJÄHRIG SIVAGM INFIZIERTER(M) AGM BZW. SCHWEINSAFFEN (<i>M. NEMESTRINA</i>)	65
ABB. 28: DARSTELLUNG DES GESAMT-AK-TITERS IM ZEITLICHEN VERLAUF [IN WOCHEN] ALLER PRIMATEN DIESER STUDIE BIS 20 WOCHEN NACH INFEKTION; GRÜNER PFEIL IMMUNISIERUNG ROTER PFEIL INFEKTION,	67
ABB. 29: DARSTELLUNG DER HUMORALEN ANAMNESTISCHEN IMMUNANTWORT IN GRÜN SIVAGM ⁺ AGM BZW ROT SIVMAC ⁺ RHEUSMAKAKEN	68
ABB. 30: DARSTELLUNG DES ANTIKÖRPERTITERS ALLER AGM IM VERLAUF DER STUDIE.....	69
ABB. 31: DARSTELLUNG DES ANTIKÖRPERTITERS ALLER RHEUSMAKAKEN IM VERLAUF DER STUDIE	71
ABB. 32: DARSTELLUNG DER OVA-ANTI-KÖRPERTITER ALLER PRIMATEN IM VERLAUF DER STUDIE.....	72
ABB. 33: DARSTELLUNG ALLER PRIMATEN, DIE ZUSÄTZLICHE IMMUNISIERUNGEN MIT OVA ERHIELTEN; GRÜNER PFEIL IMMUNISIERUNG ROTER PFEIL INFEKTION	73
ABB. 34: REAKTION DER PBMC LANGJÄHRIG SIVAGM INFIZIERTER AGM AUF SIVAGMGAG- PEPTIDPOOLS; POSITIV KONTROLLE WAR DIE STIMULATION MIT POKEWEE-MITOGEN (PWM)	73
ABB. 35: REAKTION DER PBMC AUF SIVAGMGAG PEPTIDPOOLS IM VERLAUF DER STUDIE BEISPIELHAFT AM AGM 2 UND RH 14, BEIDE TIERE WURDEN MIT SIVAGMGAGCO IMMUNISIERT	74
ABB. 36: ÜBERSICHT DES VERLAUFS DER SIVGAG-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN ALLER PRIMATEN DIESER STUDIE IMMUNISIERUNG GRÜNER PFEIL , INFEKTION ROTER PFEIL	76
ABB. 37: DARSTELLUNG DER ANAMNESTISCHEN ZELLULÄREN IMMUNANTWORT IN GRÜN SIVAGM ⁺ AGM BZW ROT SIVMAC ⁺ RHEUSMAKAKEN	77
ABB. 38: ELISPOT-ASSAY MIT EINZELPEPTIDSTIMULATION BEI EINZELNEN AGM, 8 WOCHEN NACH INFEKTION.....	78
ABB. 39: ELISPOT-ASSAY MIT EINZELPEPTIDSTIMULATION BEI EINZELNEN RHEUSAFFEN, 8 WOCHEN NACH INFEKTION	79
ABB. 40: SPEZIFISCHE CTL-REAKTION GEGEN DIE VIRUS-GAG-PEPTIDPOOLS 8 WOCHEN NACH INFEKTION, RHEUSMAKAKEN IMMUNISIERT MIT SIVAGMGAGCO UND INFIZIERT MIT SIVMAC	80
ABB. 41: SPEZIFISCHE CTL-REAKTION GEGEN DIE VIRUS-GAG-PEPTIDPOOLS 8 WOCHEN NACH INFEKTION, AGM IMMUNISIERT MIT SIVMACGAGCO UND INFIZIERT MIT SIVAGM.....	81
ABB. 42: MAMU*A01 KARTIERUNG ANHAND DES CM9-PEPTIDS	81
ABB. 43: MHC-I-EPI-TOPE FEINKARTIERUNG AM BEISPIEL AGM 7 UND RH 19.....	82
ABB. 44: DARSTELLUNG DER PLASMAVIRUSLAST ALLER AGM IM VERLAUF DER STUDIE AB DEM TAG DER SIVAGM INFEKTION [SIVAGM VIRUS/ML PLASMA] BIS 13 WOCHEN NACH INFEKTION	84
ABB. 45: DARSTELLUNG DER PLASMAVIRUSLAST ALLER RHEUSMAKAKEN IM VERLAUF DER STUDIE AB DEM TAG DER SIVMAC INFEKTION [SIVMAC VIRUS/ML PLASMA] BIS 13 WOCHEN NACH INFEKTION.....	85
ABB. 46: DARSTELLUNG DER PROVIRUSLAST ALLER AGM IM VERLAUF DER STUDIE AB DEM TAG DER SIVAGM INFEKTION [SIVAGM PROVIRUS/10 ⁶ PBMC] BIS 13 WOCHEN NACH INFEKTION.....	86

ABB. 47: DARSTELLUNG DER PROVIRUSLAST ALLER RHESUSMAKAKEN IM VERLAUF DER STUDIE AB DEM TAG DER SIVMAC INFEKTION [SIVMAC PROVIRUS/10 ⁶ PBMC] BIS 13 WOCHEN NACH INFEKTION.....	87
ABB. 48: GELBILD DER GENOTYPISIERUNGS-PCR FÜR RH 15 MAMU*A02-05 (750 BP), -*B01 (600 BP), - *B30 (500 BP) MAMU*A01 (700 BP)	88

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	dt. Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität	LTR	dt. Lange Terminale Wiederholung
AGM	Afrikanische Grüne Meerkatzen	LTNP	dt. Langzeit nicht Progressierende
AIDS	dt. Erworbenes Immunschwäche-syndrom	MACS	dt. magnetisch unterstützte Zellsortierung
AS	Aminosäure	mCMV	Murines Cytomegalie Virus
BCIP/NBT	Brom-Chlor-Indolylphosphat / Nitro Blue Tetrazolium	MHC	dt. Haupthistokompatibilitätskomplex
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung	MIP-1α/β	Makrophagen inhibierendes Protein 1 α / β
CCR5	Chemokinrezeptor 5 mit dem Motiv CC	MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
CDC	dt. Zentrum für Krankheitskontrolle	NRTI	Nukleosidale Reverse Transkriptase Inhibitoren
CO	codonoptimiert	NNRTI	Nicht-Nukleosidale Reverse Transkriptase Inhibitoren
CTL	dt. Zytotoxische T-Lymphozyten	OD	Optische Dichte
CXCR4	Chemokinrezeptor 4 mit dem Motiv CXC	OVA	Ovalbumin
DC	dt. Dendritische Zellen	PCR	dt. Polymerase-Kettenreaktion
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium	PBMC	dt. periphere mononukleäre Blutzellen
DNA	dt. Desoxyribonukleinsäure	PBS	dt. phosphatgepufferte Saline
ELISA	dt. Enzym-gebundener Immunosorbant Assay	RANTES	dt. reguliert nach Aktivierung, normal T-Zell exprimiert und sezerniert
ELISpot-Assay	dt. Enzym-gebundener Immunospot Assay	Rh	Rhesusmakaken
env	Gen des Hüllproteins (envelope)	RNA	dt. Ribonukleinsäure
FDA	dt. Zulassungsbehörde für Lebensmittel in den USA	rpm	dt. Umdrehungen pro Minute
FKS	Fötales Kälberserum	RPMI	Roswell Park Memorial Institution
gag	Gen des gruppenspezifischen Antigens	RRE	dt. Rev bindendes Element
gmcsf	Gen des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierenden-Faktors	RT	Reverse Transkriptase
HAART	hoch-aktivierte Antiretrovirale Therapie	sAIDS	simianes AIDS
HEPS	dt. dauerhaft hoch-exponierte Seronegative Individuen	SDS-PAGE	dt. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
HIV	Humanes Immundefizienzvirus	SFU	dt. Spot Bildende Einheiten
HLA	Humane Leukozyten Antigene	SFV	Semliki-Forrest-Virus
HMH	Hanah Margalit's Homepage	SIV	Simianes Immundefizienzvirus
HTLV	Humanes T-Zell Leukämievirus	TCR	dt. T-Zell Antigenrezeptor
IEDB	Immune Epitope Datenbank	TNFα	Tumornekrosefaktor α
IFNγ	Interferon γ	TRIM5α	Dreiteiliges Motiv Protein 5 α
		WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 AIDS und dessen Erreger HIV

Die weltweite Ausbreitung des humanen Immundefizienzvirus (HIV, Abb. 1) hält seit seiner Entdeckung vor ca. 25 Jahren trotz intensiver Anstrengungen zur Prävention mit dramatischer Geschwindigkeit an. Die Anzahl der infizierten Menschen liegt derzeit nach Schätzungen der WHO (World Health Organization, AIDS epidemic update December 2007; http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf) weltweit bei 33,2 Millionen mit einer Neuinfektionsrate von ca. 2,5 Millionen Menschen pro Jahr. Über 90 % der HIV-Infizierten leben in Entwicklungsländern, vorwiegend in Afrika und Asien, wobei zunehmend Kinder und Jugendliche betroffen sind. Da die Zahl der AIDS-Toten weiter exponentiell ansteigen wird, werden die bereits heute dramatischen persönlichen, sozialen und ökonomischen Konsequenzen weltweit katastrophale Auswirkungen haben.

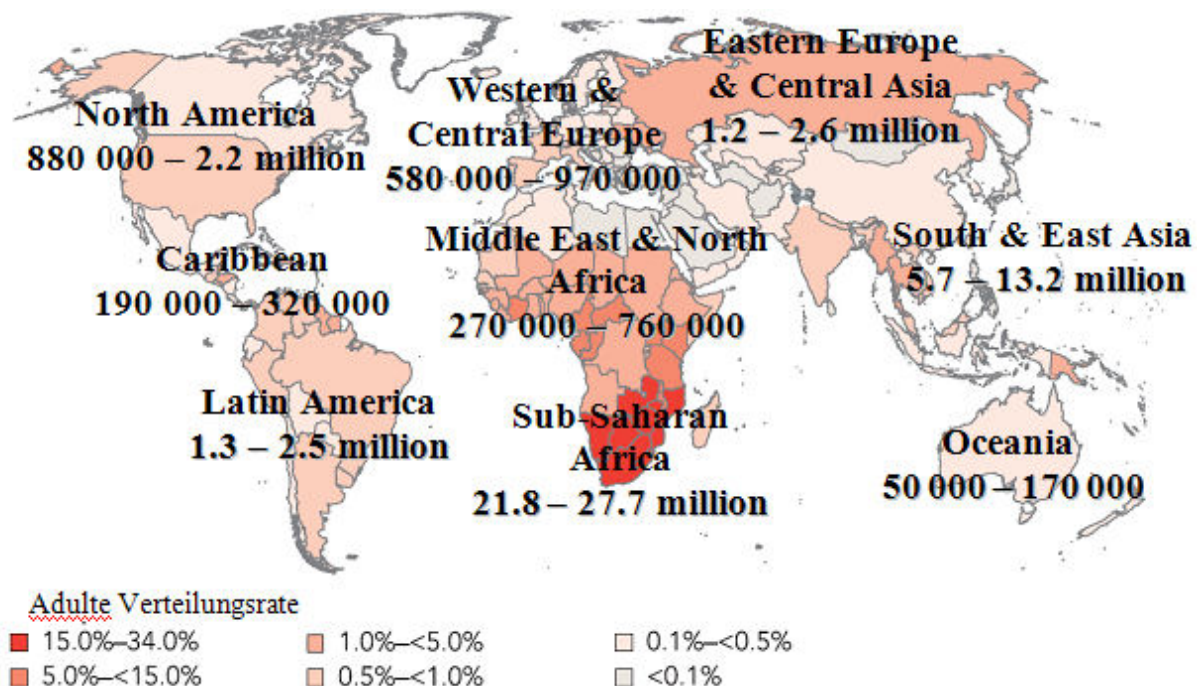


Abb. 1: Globale Verteilung von HIV-Infektionen, prozentual und total 2007
(World Health Organization, AIDS epidemic update December 2007)

1.1.1 Entdeckung, Krankheitsbild und Therapeutika

Anfang der 80iger Jahre des letzten Jahrhunderts berichtete ein Ärzteteam aus Los Angeles von vier homosexuellen Patienten, die alle an einer schwer zu behandelnden Lungenentzündungen durch *Pneumocystis carinii* litten [1]. Des Weiteren wiesen die zuvor gesunden Männer mittleren Alters einen drastischen Abfall der $CD4^+$ T-Zellzahlen, extensive mukosale Candidasen und schwere virale Infektionen (insbesondere durch das humane Cytomegalie Virus, hCMV) auf. Bei gesunden Menschen sind diese Erreger meist harmlos und entfalten vor allem in immungeschwächten Personen ihr pathogenes Potential. Zunächst als Krankheit von Homosexuellen und Drogenabhängigen bekannt, gewann die Erkrankung des Immunsystems durch das Auftreten bei heterosexuellen Kontakten, Menschen mit Hämophilie und Empfängern von Blutprodukten zunehmend an Bedeutung. Diese Befunde und weitere Berichte aus anderen amerikanischen Großstädten führten beim Center of Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta zu der Erkenntnis, dass es sich bei den beschriebenen Fällen um eine neue durch Körperflüssigkeiten übertragbare Art der Immunschwäche handelt, die als AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome – erworbenes Immundefizienz Syndrom) bekannt wurde.

1983 gelang erstmals Mitarbeitern um den Wissenschaftler Luc Montagnier vom Pasteur-Institut in Paris die Isolation des Erregers von AIDS aus lymphatischem Gewebe eines Patienten [2]. Dadurch wurde der Erreger zunächst als LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) oder durch die Gruppe um Gallo als HTLV-III (humanes T-Zell Leukämie Virus III) [3] bezeichnet und später in HIV umbenannt. Die Entdeckung wurde durch mehrere Studien bestätigt [3, 4, 5] und HIV als neuer Vertreter der Lentiviren aus der Familie der *Retroviridae* klassifiziert. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt das simiane Immundefizienzvirus (SIV) und HIV als Vertreter der Lentiviren (Abb. 2).

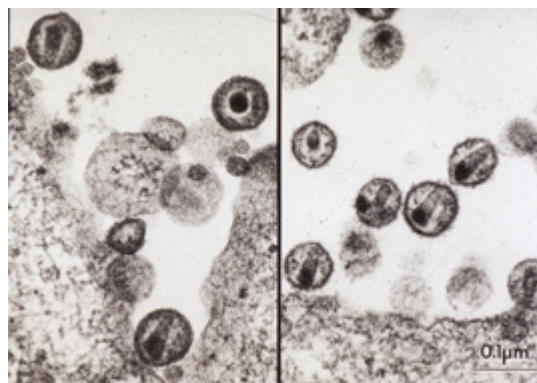


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme: links von SIV und rechts von HIV
(http://www.cnprc.ucdavis.edu/pages/research/research_units/virology_immunology.html)

Anfangs ähnelt die Symptomatik einer HIV-Infektion einer Grippe, die von selbst wieder abklingt. Nach einer 8-10 jährigen asymptomatischen Latenzphase beginnt die typische AIDS-Erkrankung, welche mit einer starken Verringerung der CD4⁺-Lymphozyten, der Zerstörung von Follikeln und dem lymphatischen Gewebe [6] sowie der Degeneration des Nervengewebes und dem Auftreten des Wasting Syndroms (Gewichtsverlust und Diarrhöe) einhergeht [7, 8, 9, 10]. Das Ausbrechen opportunistischer Infektionen wie durch *Pneumocystis carinii* hervorgerufene Lungenentzündung, kryptokokkoide Meningitis und Kaposi sarcoma [11] gehören zu den charakteristischen Krankheitsmerkmalen von AIDS und führen, bedingt durch das geschwächte Immunsystem des Patienten, zum Tod.

Bislang konnte noch kein Impfstoff entwickelt werden, der eine Infektion mit HIV oder die Progression zu AIDS verhindern kann, jedoch wurden im Bereich der therapeutischen Möglichkeiten, insbesondere in den letzten Jahren, große Fortschritte gemacht. Das erste ursprünglich für eine andere Applikation entwickelte Therapeutikum ist Zidovudin und fungiert als Nukleosid-Analogon zur Inhibition der Reversen Transkriptase, einem viralen Schlüsselenzym. Durch die Zulassung von Zidovudin durch die Food and Drug Administration (FDA) stand im Jahre 1987 die erste wirksame Therapie zur Verfügung. Im Jahre 1991 folgte ein weiterer Nukleosidaler Reverse Transkriptase Inhibitor (NRTI), Didanosin. Durch die Monotherapie mit Zidovudin konnte die neonatale Transmissionsrate von 25,5 % auf 8,3 % gesenkt werden [12]. Dennoch suchte man nach weiteren Therapeutika, da die Monotherapien nur für eine kurze Zeit wirkten und schon bald limitierte Aktivität gegen HIV zeigten. 1995 erfolgte die Entwicklung von Proteaseinhibitoren, welche gegen die virale Protease wirken, und 1996 die Zulassung von Nevirapin, einem Nicht-NRTI (NNRTI) [11].

Mit modernen Therapieansätzen aus Kombinationen von Inhibitoren der Reversen Transkriptase und der viralen Protease ist es bei einem Teil der Patienten möglich geworden, die Virusreplikation dauerhaft unter die Nachweisgrenze zu senken. Diese dreifach Kombinationstherapien werden unter dem Begriff Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) zusammengefasst. In den meisten Fällen allerdings resultiert eine Unterbrechung der Therapie in einem raschen Anstieg der Plasmavirusbelastung. Somit wird deutlich, dass selbst während einer langen antiretroviralen Kombinationstherapie, infektiöses Virus, in Form von ins Genom integriertem Provirus, persistiert [13].

Da ein wirksamer Impfstoff noch nicht existiert, ist Prävention die einzige Möglichkeit, eine HIV-Infektion zu verhindern. Es gibt drei Säulen der Prävention: der Schutz vor sexueller, parenteraler und perinataler HIV-Transmission. Dabei sind unzureichende Aufklärung, ungeschützter Geschlechtsverkehr, unzureichend frühe Diagnostik von sexuell übertragbaren Krankheiten, ungenügende Sicherheit für Blutprodukte und das Personal im Gesundheitswesen, die Verbreitung von

HIV durch Drogeninjektion sowie das Stillen von Kindern HIV-infizierter Mütter einige verbesserungswürdige Aspekte [14].

Die Latenzzeit zwischen der HIV-Infektion und der Entwicklung von AIDS kann innerhalb der Patienten sehr unterschiedlich sein. Eine kleine Minderheit (1-5 %) der HIV-infizierten Personen wird als „Long-Term Non-Progressors“ (LTNP, dt.: Langzeit Nicht-Progressierende) bezeichnet. Wie sich diese Gruppe zusammensetzt, wird sehr unterschiedlich definiert. Die LTNP bleiben mehr als 10-15 Jahre oder länger AIDS-frei, entwickeln keine klinischen Symptome, haben eine stabile CD4⁺ T-Zellzahl von ungefähr 500 CD4⁺ Zellen/ μ L, weisen ein geringes Niveau von HIV im peripherem Blut auf und haben keine Vergangenheit mit antiretroviraler Therapie [15, 16, 17, 18].

In den letzten Jahren ist bekannt geworden, dass die Empfänglichkeit für eine HIV-Infektion nicht uniform ist und einige Personen scheinbar nicht infiziert werden, obwohl sie sich dem Virus in potentiell infektiöser Art und Weise aussetzen. Diese Gruppe der so genannten „Highly-Exposed, Persistently Seronegatives“ (HEPS, dt.: hoch-exponierte, dauerhaft seronegative Individuen) beinhaltet unter anderem eine Gruppe Prostituierten in Nairobi und die HIV-negativen Partner HIV-infizierter Patienten bei ungeschütztem Geschlechtsverkehr. Die anfangs nicht nachweisbare Antikörperantwort und Virämie gaben unter realen Bedingungen den einzigen Hinweis auf eine mögliche Immunität gegen HIV [19]. Durch eine Verbesserung der Detektionsmethoden konnten spezifische Zytotoxische T-Zellen (CTLs), mukosale Antikörper und HIV in sehr geringen Mengen in HEPS nachgewiesen werden [20, 21, 22, 23], so dass eine sterile Immunität ausgeschlossen werden kann und die Replikation des Virus sehr stark reduziert zu sein scheint.

1.1.2 Phylogenetik der Primaten-Lentiviren

Die Viren HIV und SIV (Abb. 2 links) gehören zur Gattung der Lentiviren, welche zur Familie der *Retroviridae* zählen. Die humanen Lentiviren werden in zwei Gruppen eingeteilt: HIV-1 [2] und HIV-2 [24], die in Sequenzvergleichen ca. 42 % Homologie zueinander aufweisen [25]. HIV-1 splittet sich in die Gruppen M („main“, dt.: Hauptgruppe), N („new“ oder „non-M“, dt.: neue oder nicht-M Gruppe) und O („outlier“, dt.: Ausreißergruppe). Die Gruppe M des HIV-1 unterteilt sich in weitere zehn Subtypen (Subtyp A - H, J und K) und rekombinante Formen [26] (Los Alamos Datenbank). Rekombinante HIV-Varianten entstehen, wenn es zu zwei in kurzem Abstand erfolgten Infektionen mit Viren verschiedener Subtypen kommt. Dabei kann während der Reversen Transkription durch die „copy choice“ Rekombination (dt.: Replikation mit Wahlmöglichkeit) das Template gewechselt werden und eine rekombinante Form des Virus (CRF: Circulating Recombinant Form) entstehen [27]. Anhand weiterführender Sequenzanalysen konnten die Subtypen

E [28, 29] und G [30] als rekombinante Formen von A (HIV A/E und HIV A/G) identifiziert werden und stellen somit keine eigenständige Subtypklasse dar [31]. Aufgrund der hohen Mutationsrate von HIV und der Sequenzvarianz zwischen den einzelnen Subtypen, beispielsweise im *env*-Gen 30 % und im *gag*-Gen 14 % [32, 33, 34], ist es sehr schwierig einen Impfstoff mit breiter Spezifität zu entwickeln. Der HIV-1 Subtyp B herrscht in Nordamerika, Europa und Australien vor, wohingegen der Subtyp C Virus in Asien und die Subtypen A und C in Afrika endemisch sind. Aufgrund der hohen Infektionsrate in Afrika und Südost-Asien tragen die meisten infizierten Menschen den Subtyp C Virus.

HIV-2 ist hauptsächlich nur in Westafrika endemisch und unterteilt sich in die Gruppen A-F. HIV-2 scheint wesentlich weniger pathogen zu sein als HIV-1. Die HIV-2-Infektion schreitet langsamer voran, hat eine geringe Viruslast und entspricht so eher einer chronischen HIV-1-Infektion [26, 35].

Mittlerweile sind über 30 verschiedene Affen-Spezies bekannt, die bis zu 50 % endemisch mit ihren eigenen simianen Immundefizienz-Virusstämmen infiziert sind [35, 36] und potentiell Zoonosen im Menschen oder anderen Primatenspezies erzeugen können.

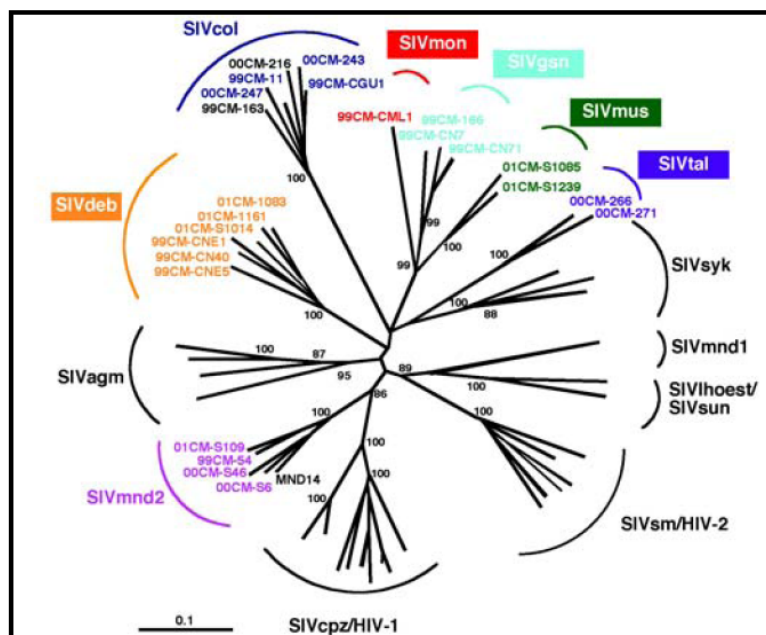


Abb. 3: Phylogenetischer Stammbaum der Primaten Lentiviren

Der Ursprung der jeweiligen Lentiviren ist im Drei-Buchstaben Kürzel dargestellt, zum Bsp. SIVagm von Afrikanischen Grünen Meerkatzen (*Chlorocebus aethiops*), HIV-1/SIVcpz von Schimpansen (*Pan troglodytes*) oder HIV-2/SIVsm von grauen Halsbandmangabes (*Cercocebus atys*). Die kürzlich entdeckten Lentiviren sind farblich unterlegt. Der phylogenetische Baum beruht auf der Sequenz eines 650 bp langen Fragmentes aus *pol* und der Anordnung anhand der neighbor-joining-Methode. Der dargestellte 0.1-Balken entspricht in der Länge einer Divergenz von 10 % [35].

Die größte Sequenzidentität besteht jeweils zwischen den SIV-Isolaten einer Wirtsspezies, da die verschiedenen SIV Sequenzen einer Primatenart Cluster bilden (Abb. 3) [35]. Diese Wirtsspezifität spricht für eine phylogenetisch lange Koevolution von SIV Subspezies und ihren Primatenspezies. Erfolgt eine Kreuzspeziestransmission eines Primaten-Lentivirus auf einen neuen Wirt, kann bedingt durch diesen Wirtswechsel im neuen Wirt ein pathogener Effekt ausgelöst werden. Durch die Übertragung des Virus von diesem neuen Wirt auf ein Individuum derselben Spezies, kann eine Epidemie ausgelöst werden. So führte die experimentelle Infektion von asiatischen Rhesus- und Schweinsaffen mit SIVsm zu einer übertragbaren Form der AIDS Erkrankung bei Primaten [37, 38].

Durch weiter entwickelte Nachweismethoden konnte mittlerweile in afrikanischen Blutplasma-Proben aus dem Jahr 1959 die Kontamination durch HIV nachgewiesen werden [39]. Inzwischen siedelt man den Spezies-Sprung in den 30iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts an, welcher über SIVcpz (HIV-1) und SIVsm (HIV-2) von den Schimpansen und grauen Halsbandmangaben erfolgte [40, 41, 42, 43] und zur AIDS-Pandemie führte. Die Übertragung durch Jagdverletzung und Verletzung bei der Zubereitung von Speisen stellt eine plausible Transmissionsroute dar [44]. Die daraufhin folgende weltweite Ausbreitung von HIV-1 ist wahrscheinlich auf den ökonomischen, sozialen und gesellschaftlichen Wandel in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts zurückzuführen [45].

Die Einteilung von HIV-1 in die drei Gruppen M, N und O legt den Schluss nahe, dass sich drei unabhängige Übertragungsereignisse auf den Menschen zugetragen haben müssen, bei HIV-2 sind es in Abhängigkeit der Subtypen mindestens vier Transmissionsereignisse [44].

1.1.3 HIV-Morphologie und Genomstruktur

Der strukturelle Aufbau eines infektiösen HIV- bzw. SIV-Partikels entspricht dem der übrigen Retroviren mit einem Durchmesser von 110 nm; sie bestehen aus einer Lipid-Doppelmembran, verankert mit dem transmembranen Glykoprotein gp41, äußerer Proteinhülle (p17), Kapsidhülle (p24 bei HIV, p27 bei SIVmac und SIVagm) und dem Ribonukleinsäure-Enzym-Komplex (RNA-Enzym-Komplex, Abb. 4). Das sogenannte externe Glykoprotein (gp120) ist nicht kovalent mit dem darunter liegenden transmembranen Protein verbunden. Diese Heterodimere bilden in der Virushülle Homotrimere [23] und vermitteln so bei der Infektion einer Zelle die Kontaktaufnahme mit ihrem zellulären Rezeptor sowie die anschließende Fusion der viralen und zellulären Membran.

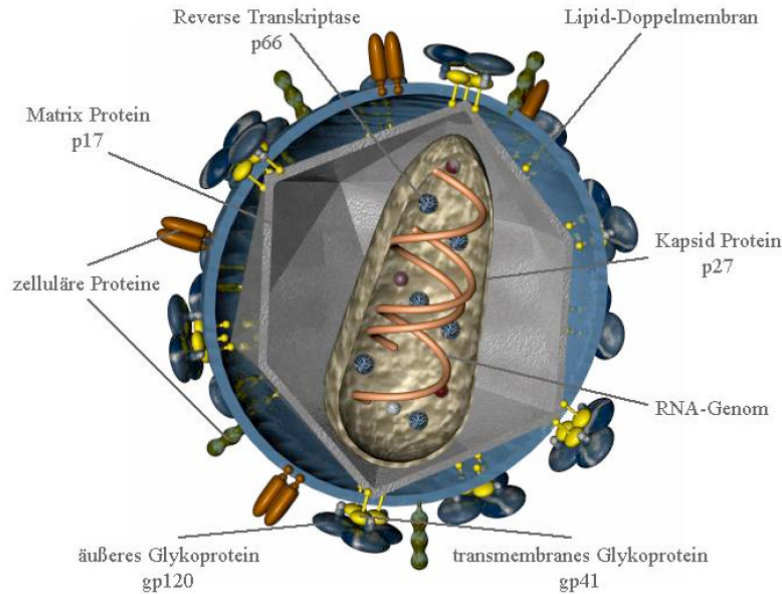


Abb. 4: Schematische 3D-Struktur von SIV (Dr. S. Norley, RKI)

Als Erbsubstanz besitzen die Lentiviren (Abb. 4) zwei identische, jeweils etwa 9,7 kb große einzelsträngige RNA-Moleküle, welche in Form einer eukaryontischen mRNA vorliegen, d.h. mit einem 7-Methylguanin-Rest und polyadenyliertem 3'-Ende. Die virale mRNA ist an beiden Enden mit regulatorischen Sequenzen (LTR, long terminal repeats) versehen. Diese sind für die Initiation und Termination der Transkription sowie für die Integration der viralen Erbinformation in die genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) der Wirtszelle zuständig. Außerdem besitzt jede mRNA eine von der vorherigen Wirtszelle stammende tRNA, welche an komplementäre Basensequenzen angelagert ist und die Primerfunktion erfüllt.

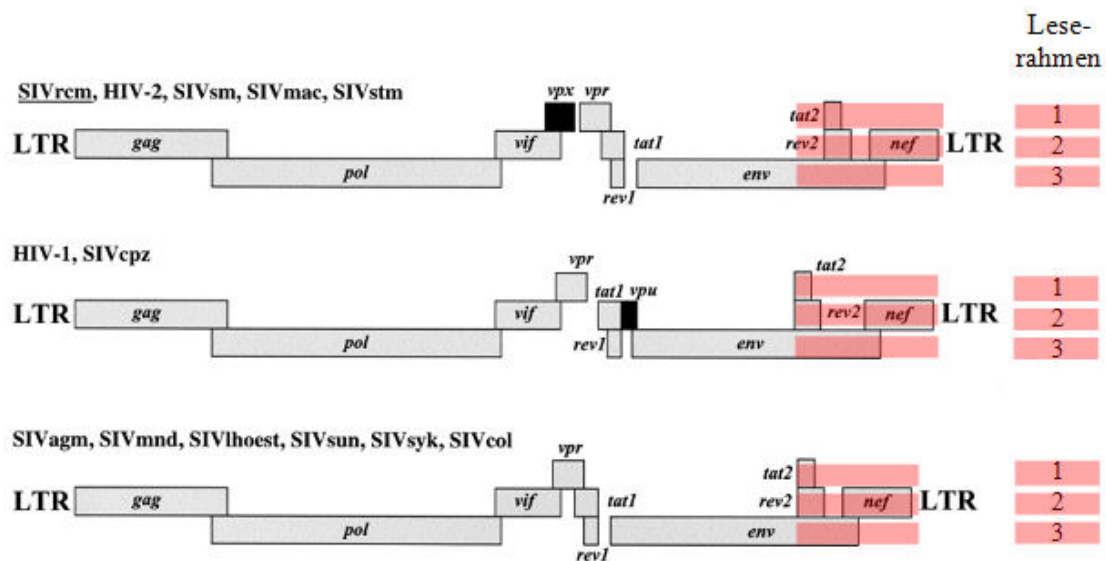


Abb. 5: Aufbau des Lentivirus-Genoms [46]

Die Immundefizienzviren der Primaten enthalten wie alle Retroviren die drei Gene *gag*, *pol* und *env* (Abb. 5). *Gag* kodiert für die inneren Kernproteine, die an die virale RNA binden, und das Matrixprotein p17. Das *pol*-Gen (Polymerase) enthält die Information zur Synthese der Reversen Transkriptase (RT), der Integrase und einer Protease. Das *env*-Gen (envelope) kodiert für die Glykoproteine der Virushülle, die in die äußere Lipid-Doppelschicht integriert werden. Die Familie der Lentiviren zeichnet sich durch die essentiellen regulatorischen Gene *tat* und *rev* aus, die an der Regulation der RNA-Transkription, des Spleißens und am Export der viralen mRNA aus dem Nukleus beteiligt sind. Bei den Lentiviren sind vier weitere akzessorische Gene vorhanden: *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* bei HIV-1, während bei HIV-2 *vpu* durch *vpx* ersetzt ist.

Die von diesen akzessorischen Genen kodierten Proteine sind für die Replikation *in vitro* nicht notwendig, beeinflussen *in vivo* aber die Replikationsfähigkeit und Pathogenität [47]. Der Phänotyp dieser akzessorischen Proteine setzt sich aus vielfältigen Funktionen zusammen: Steuerung der viralen Infektiosität durch Degradierung des antiviralen Faktors APOBEC3 (Vif) [48], Zellzyklus-Stop in der G₂-Phase (Vpr) [49], Verhinderung der intrazellulären Komplexbildung zwischen gp160 und dem CD4-Rezeptor (Vpu, Vpx) [50, 51] und Pathogenität durch Verminderung der Oberflächenmoleküle wie CD4 und MHC-I (Nef) [52].

1.1.4 Replikationszyklus

Die Infektion einer Zelle mit Lentiviren beginnt mit der Anheftung des Virus an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle, wobei es zur hochaffinen Wechselwirkung zwischen dem viralen Glykoprotein (gp120) und dem CD4-Rezeptor der Zielzelle kommt. Durch Beteiligung des Transmembranproteins gp41 von HIV oder SIV erfolgt die Fusion von Wirtszell- und Virusmembran [6, 53].

Die bevorzugten Zielzellen sind in erster Linie T-Lymphozyten, aber auch Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und Mikrogliazellen dienen dem Virus als Reservoir [53, 54]. Chemokin-Rezeptoren der Familie der CC- bzw. CXC-Rezeptoren fungieren zusätzlich zum CD4-Rezeptor als essentielle Ko-Rezeptoren für HIV und SIV [55] und bestimmen den Tropismus der unterschiedlichen HIV- und SIV-Stämme. Insbesondere in der kritischen frühen Phase der HIV-Infektion mit Subtyp B Viren existieren vorwiegend CCR5-Rezeptor-trope Viren, die in der späteren symptomatischen Phase der Infektion in 50 % der Fälle ihren Phänotyp zu CXCR4-Rezeptor-tropen Virusstämmen verändern [54]. Die simianen Viren benutzen hauptsächlich den CCR5-Rezeptor, um in die Zelle einzudringen [56].

Das Nukleokapsid, welches die virale RNA und die viralen Enzyme enthält, gelangt nach der receptorvermittelten Infektion in die Zielzelle und setzt dort ihren Inhalt frei. Die Initiation der

Replikation erfolgt durch die virale RNA, welche unter Verwendung der als Primer dienenden aus der vorherigen Wirtszelle stammenden tRNA, von der viruseigenen Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben wird. Die trifunktionelle RT ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die durch ihre RNaseH-Aktivität die Hydrolyse des RNA/DNA-Stranges ermöglicht. Der Heteroduplex zerfällt und wird anschließend durch die DNA-Polymerase-Aktivität der RT zur Doppelstrang-DNA komplettiert. Die Integration der genetischen Information erfolgt nach Transport der DNA-Doppelhelix in den Wirtszellkern durch die im Zytoplasma ebenfalls freigesetzte Integrase, es entsteht das Provirus. Im Wirtsgenom befindet sich nun die provirale DNA, flankiert von regulatorischen Kontrollsequenzen, die unter dem Begriff Long Terminal Repeats (dt.: lange terminale Wiederholung, LTR) zusammengefasst sind. Ob das Provirus transkribiert wird oder latent vorliegt und bei jeder Zellteilung an die Tochterzelle weitergegeben wird, hängt vom Aktivierungszustand der Zelle ab [53]. Ist die T-Zelle aktiviert, kommt es zur Transkription der integrierten DNA und zur Translation der viralen RNA. Dabei werden über 30 verschiedene RNA-Spezies aus der viralen 9 kb RNA durch differenzielles Spleißen gebildet. Die dabei entstehenden viralen mRNA-Moleküle kodieren für die essentiellen regulatorischen Proteine Tat, Rev sowie Nef, wobei Tat und Rev die Bildung von ungespleißter und einfach gespleißter RNA regulieren. Die ungespleißte RNA dient entweder als genomische RNA, welche in neue Viruspartikel verpackt wird, oder als mRNA zur Translation von Gag- und Pol-Vorläuferproteinen. Die gespleißte mRNA fungiert als Translationsmatrix für die Gene *env*, *vif*, *vpr*, und *vpu*. Die virale Protease spaltet die Gag- und Pol-Vorläuferproteine in die einzelnen funktionellen Proteine. Die Synthese des Env-Vorläuferproteins gp160 erfolgt aus einer gespleißten viralen mRNA. Die Selbstaggregation der viralen Proteine zu neuen Viruspartikeln erfolgt an der Zellmembran. Als Erbinformation für einen neuen Infektionszyklus wird ungespleißte mRNA in das Viruspartikel verpackt und die neu gebildeten Viren knospen aus der Wirtszelle aus, was als „budding“ (dt.: Ausknospfung) bezeichnet wird.

1.1.5 Natürliche Inhibitoren gegen HIV

Einige natürliche Faktoren im Körper des Menschen wirken inhibierend auf HIV, vermögen es allerdings nicht, HIV aus dem Körper komplett zu entfernen und so eine vollständige Eliminierung des Virus zu erreichen.

Die β -Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β dienen als physiologische Liganden des CCR5-Rezeptors und konkurrieren mit HIV um die Bindungsstelle [55, 57, 58]. Neben den β -Chemokinen gibt es noch weitere Chemokine, die die HIV-Infektion inhibieren, wie zum Beispiel Interleukin-16 (IL-16), welches von aktivierten CD8⁺-Zellen sezerniert wird und durch die Bin-

dung an den CD4-Rezeptor die HIV- sowie SIV-Replikation inhibiert [59, 60, 61]. Nach anfänglicher Euphorie wurde jedoch schnell klar, dass die β -Chemokine sowie IL-16 zwar wirksame Inhibitoren von HIV sind, aber selbst in Kombination mit anderen inhibierenden Substanzen keine komplette Klärung des Virus vermögen und somit als Therapeutikum keine Verwendung finden können.

Der wirtsspezifische Restriktionsfaktor TRIM5 α (Tripartite Motif Protein 5 α) inhibiert durch seine Assoziation mit dem HIV-1 Kapsid den Eintritt des Virus in die Zelle [62, 63]. Jedoch können nur einige TRIM5 α -Varianten, bevorzugt die von Altweltaffen, mit dem HIV-1 Kapsid eine Assoziation eingehen. Das TRIM5 α vom Klammeraffen, zu den Neuweltaffen zugehörig, inhibiert zusätzlich noch SIVmac und SIVagm signifikant [64]. Das TRIM5 α von Rhesusaffen lässt HIV-1 zwar noch in die Zelle eintreten, allerdings entsteht ein Block vor der Reversen Transkription, wodurch eine effektive Replikation des Virus und somit eine Infektion der Rhesusmakaken durch HIV-1 verhindert wird [65].

1.2 Immunologie: Humorale und zelluläre Immunantwort

1.2.1 Humorale Immunantwort

Innerhalb der ersten 4-5 Wochen nach Infektion kommt es zur Bildung von Antikörpern (Seroconversion), zuerst hauptsächlich gegen das Kapsidprotein Gag und das Hüllprotein Env, später auch gegen alle anderen viralen Proteine. Die früh gebildeten Antikörper gegen das Hüllprotein werden beim Nachweis einer HIV-Infektion als die zu bestimmende Größe herangezogen. Unter den gebildeten Antikörpern sind auch neutralisierend wirkende, welche die Bindung des Virus an die Zelle verhindern und zur Viruslyse führen. Aus Serum HIV-infizierter Patienten isolierte Antikörper haben nur eine schwache neutralisierende Wirkung auf Primärisolate von HIV-1, meistens binden sie an einer Stelle des Hüllproteins, welche für den Viruseintritt in die Zelle nicht kritisch ist, und wirken somit nicht neutralisierend [66]. Neutralisierende Antikörper sind gegen verschiedene neutralisierende Domänen gerichtet, wie der dritten hypervariablen Schleife (V3 loop) des Envelope-Glykoproteins, der CD4 Bindungsseite von Env und dem Transmembranglykoprotein gp41. Des Weiteren ist die hypervariable Schleife der Interaktionspartner zwischen dem Envelope-Glykoprotein und den Chemokin-Rezeptoren. Einige Env-spezifische Antikörper weisen eine infektionsverstärkende Wirkung auf, dies ist auch bei anderen retroviralen Infektionen in verschiedenen Tiermodellen (Affen, Katzen und Pferde) nachgewiesen worden [66, 67, 68, 69, 70]. Spezifische Antikörper gegen die hypervariable Schleife sind die ersten zirkulierenden neut-

ralisierenden Antikörper im Körper eines HIV-Infizierten. Den neutralisierenden Antikörpern wird eine wichtige Rolle in der späteren Kontrolle des Virus zugeschrieben, dennoch können sie im Körper keine Kontrolle der Virusreplikation bewirken [71], da es immer zur Bildung von Fluchtmutanten kommt.

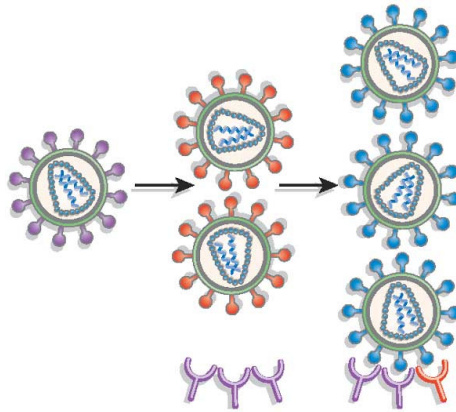


Abb. 6: Flucht vor der Antwort neutralisierender Antikörper (100)

Trotz neutralisierender Antikörper kann HIV das Immunsystem umgehen und unterdrücken. Es gibt mehrere Gründe für das Versagen des Immunsystems bei fortschreitender Krankheit hin zu AIDS. Aufgrund der hohen Fehlerrate der Reversen Transkriptase, der RNA Polymerase und der hohen Replikationsrate entstehen virale Varianten, die dem Immunsystem besser oder schlechter entgehen. Nach akuter Infektion entwickeln sich neutralisierende Antikörper nur sehr langsam, sie sind spezifisch für frühere Isolate eines Patienten und üben Selektionsdruck aus. Das Virus entgeht dem Immunsystem sehr schnell, da es neue Varianten generiert, die von den initialen Antikörpern nicht erkannt werden, die sogenannten Fluchtmutanten. Wie in Abb. 6 schematisch dargestellt, entsprechen die Antikörper nicht der aktuellen Viruspopulation und werden somit unwirksam. Dieser Vorgang wiederholt sich immer wieder [71]. Die Resistenzbildung ist bei cross-clade spezifischen Antikörpern (dt.: subtyp-übergreifenden Antikörpern) eher gering. Die schützende Wirkung dieser Antikörper wurde bereits einzeln oder in Kombination durch passiven Transfer im Tiermodell unter Beweis gestellt [72]. Wenn die genaue Struktur zur Induktion eines solchen Antikörpers bekannt wäre, könnte durch Nachbildung ein Immunogen geschaffen werden, welches den gleichen neutralisierenden Antikörper induziert, der ursprünglich in Langzeitüberlebenden gefunden wurde [73].

Durch die Aktivierung der Komplementkaskade [74] können infizierte Zellen oder Viren mit Lipidhülle durch Lyse zerstört werden. Diese Virolyse kann direkt oder unter Mitwirkung von Antikörpern erfolgen [75]. Da der Membranangriffs-Komplex das Ziel durch Aufbau eines osmotischen Dichtegradienten vernichtet, dieser aber bei HIV nicht sehr ausgeprägt und dadurch für die

osmotische Lysis nicht so anfällig ist, geht man davon aus, dass nur das Auflösen der Virus-Membran das Virus schädigen könnte [76, 77]. Allerdings bietet möglicherweise die herkunftsbedingte Integration bestimmter zellulärer Membranproteine wie CD46, CD55 und CD59 in die Hülle dem Virus *in vivo* Schutz vor Angriffen des Komplementsystems [78, 79, 80], wohingegen die HIV-Stämme *in vitro* sehr wohl eine Aktivierung der Komplementkaskade in Patientenseren induzieren [81, 82, 83].

Wie die Komplementkaskaden-Aktivierung ist die antikörperabhängige zelluläre Toxizität (ADCC) ebenfalls ein Mechanismus der humoralen Immunabwehr gegen HIV. Die ADCC ist ein Vorgang, bei dem der variable Teil des Antikörpers an die Virus infizierte Zelle bindet und diese somit opsonisiert. Spezialisierte Killerzellen erkennen über den Fc-Teil der Antikörper die virusinfizierte Zelle und vernichten sie. Die ADCC ist schon in der frühen Phase der Infektion *in vitro* nachweisbar und weist ein breites Spektrum auf [84, 85].

1.2.2 Zelluläre Immunantwort

Eine weitere wichtige Rolle in der Kontrolle der Virusreplikation und somit der Etablierung einer HIV-Infektion nehmen die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und die T-Helfer Zellen ein [32]. Das Auftreten von HIV- bzw. SIV-spezifischen CTL erfolgt schon innerhalb der ersten Woche nach Exposition und korreliert stark mit dem rapiden Abfall der primären Virämie in den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wie auch im Plasma [86, 87, 88]. HIV-spezifische CTL sind in beträchtlicher Anzahl in verschiedenen Organen und Körperflüssigkeiten von HIV-Infizierten zu finden, wie dem peripheren Blut, dem lymphatischen Gewebe, der Milz, der vaginalen Mukosa sowie der Spermienflüssigkeit und dem Liquor [71]. Durch Zell-Zell-Kontakt können CTL HIV-infizierte Zellen *in vitro* lysieren und eine Ausbreitung der Infektion auf die virale Replikation durch Zytokinsekretion verhindern oder fördern. Die betreffenden Zytokine sind Interferon- γ (INF γ), welches die HIV-Replikation inhibiert, und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α), welcher durch Aktivierung des HIV-Promotors der 5'-LTR die Virus-Replikation hochreguliert [89]. Außerdem werden die β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sezerniert, welche durch Konkurrenz um bzw. Herunterregulierung des CCR5-Korezeptors den Eintritt von HIV in die Zelle unterdrücken [58, 71]. CTL sind in der Lage, infizierte Zellen zu erkennen und zu lysieren, bevor die Knospung von neuen Viruspartikeln vollzogen wurde [90].

Einen Hinweis, dass CD8⁺-T-Zellen an der Kontrolle einer HIV-Infektion beteiligt sind, liefert eine Studie, in welcher Rhesusmakaken vor einer Infektion mit SIVmac die CD8⁺-Zellen depletiert wurden [91]. Die unbehandelten Kontrolltiere konnten ihre Viruslast nach dem initialen An-

stieg auf ein normales Niveau senken, wohingegen sich die Viruslast der $CD8^+$ -T-Zell-depletierten Tiere auf ein deutlich höheres Niveau einstellte.

Die Flucht des Virus vor der CTL Immunantwort des Körpers während der akuten und chronischen Infektion ist ein anderer Weg, dem Immunsystem zu entgehen. CTL erkennen virale Peptide auf HIV-infizierten Zellen und lysieren diese. Erfolgt nun eine Mutation, die eine Aminosäure des Peptids verändert, ist es möglich, dass das Peptid entweder von HIV-spezifischen CTL nicht mehr erkannt wird oder aufgrund der Mutation von der HIV-infizierten Zelle nicht präsentiert werden kann [58, 71, 92].

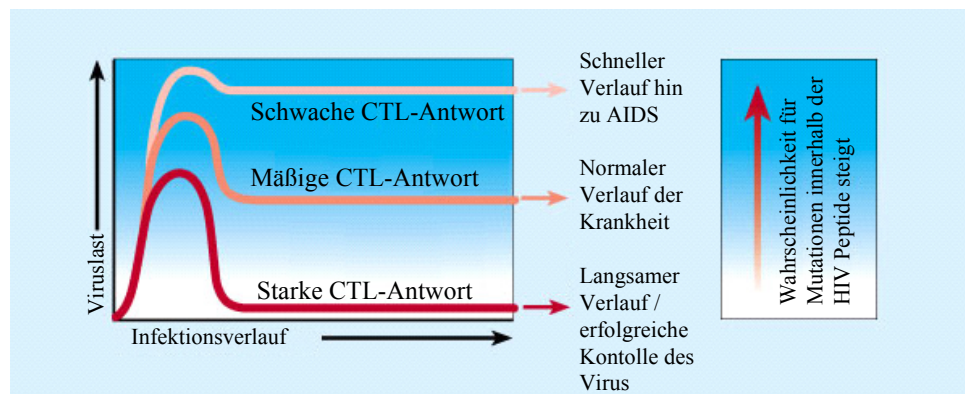


Abb. 7: Die Antwort des Immunsystems auf HIV als Auslöser für AIDS [93]

HIV-1 produziert in einer infizierten Person 10^9 - 10^{10} Viruspartikel pro Tag, jedes Viruspartikel mit ein oder zwei neuen Mutationen [94, 95]. Allerdings sind durch diese Mutationen nicht alle neuen Virionen replikationsfähig und infektiös. Mit steigender Viruslast steigt die Wahrscheinlichkeit für Mutationen, die zur Bildung von Fluchtmutanten führen können (Abb. 7) [93].

Ein weiterer Grund für die Persistenz der HIV-Infektion, trotz Therapie, sind intrazelluläre HIV-Reservoirs. Reservoirs dienen dem Virus dazu, dem Druck durch das Immunsystem und antiretrovirale Therapie standzuhalten und im Wirt zu persistieren. Als Reservoir dienen aktivierte, ruhende („Resting“, im G_1 -Stadium der Zellteilung) und ruhende („Quiescent“, im G_0 -Stadium der Zellteilung) T-Zellen sowie Dendritische Zellen und Makrophagen. Letztere werden mit Hilfe des CCR5-Ko-Rezeptors infiziert, haben infiziert eine Halbwertszeit von 14 Tagen und gelten als die bedeutendsten Reservoirs, weil die Plasmavirämie hauptsächlich durch diese Makrophagen aufrechterhalten wird. Die „Resting“ T-Zellen und die Dendritischen Zellen haben eine Halbwertszeit von sechs Monaten, wobei letztere direkt infizierbar sind, die Virionen einschließen und an $CD4^+$ -Zellen weitergeben. Bei Follikulären Dendritischen Zellen im lymphatischen Gewebe und bei „Quiescent“ T-Zellen geht man von einer Halbwertszeit von 44 Monaten aus [6, 53].

1.2.3 Haplotyp und MHC-Molekül

Die Humanen Leukozyten Antigene (HLA) sind die Genprodukte eines hoch variablen Genkomplexes auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 des menschlichen Genoms und erhielten ihre Bezeichnung aufgrund der Entdeckung im Zusammenhang mit Transplantationsstudien. Der HLA-Genort codiert für hochpolymorphe Oberflächenglykoproteine der Klasse I und II, die als MHC-Moleküle (major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex) bezeichnet werden. $CD8^+$ -CTL präsentieren unterschiedlichen zirkulierenden Zellen auf ihren MHC-I-Molekülen eigene und virale Peptide (Abb. 8) [96].

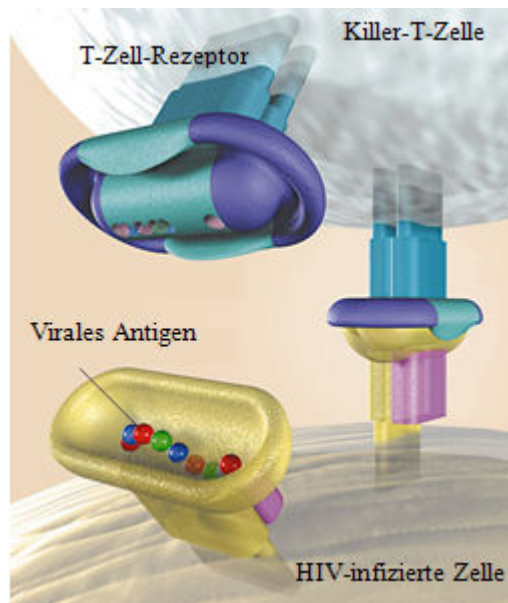


Abb. 8: Bildung eines T-Zell-Rezeptor-MHC-I-Komplexes mit eingeschlossenem viralem Peptid

Es bildet sich eine immunologische Synapse heraus. Der für MHC-I-Moleküle codierende Genlocus ist durch serologische Verfahren definiert worden und erhielt die Bezeichnung HLA-A, -B und -C. Das MHC-I-Molekül setzt sich aus einer α -Untereinheit mit drei Domänen und dem β -Mikroglobulin zusammen. Das MHC-II- Oberflächen-Molekül ist ein Heterodimer aus einer hochpolymorphen α -Kette und einer β -Kette und befindet sich auf der Zelloberfläche von B-Zellen, Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen. Dort präsentieren sie $CD4^+$ - T-Helfer- Zellen vornehmlich exogene Peptide. Der für MHC-II-Moleküle codierende Genlocus ist die D-Region der HLA und erhielt die Bezeichnung HLA-DR, -DQ und -DP. Da die MHC-I-Moleküle die viralen Peptide präsentieren, spielen nicht nur die CTL in der Kontrolle einer HIV-Infektion eine tragende Rolle, sondern ebenso die MHC-Moleküle. Der Polymorphismus und die Polygenität dieses Genbereichs führen zu einer hohen Variabilität im Haplotyp und zur Varianz von Mensch zu Mensch [97]. Somit ist das Repertoire der präsentierbaren Peptide definiert, diese

sind optimaler Weise 8-10 Aminosäuren lang. Die bekannten CTL-Epitope im viralen Genom sind in der Veröffentlichung von Frahm et al. (2006) in der HIV-Datenbank Los Alamos zusammengefasst (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunolgy/maps/ctl/ctl.pdf>).

Verschiedene Haplotypen scheinen sich auch im Verlauf der Infektion zu unterscheiden, beispielsweise haben verschiedene Arbeitsgruppen Hinweise darauf gefunden, dass Patienten mit dem heterozygoten Haplotyp HLA-B27 und -B57 langsam progressieren. Patienten mit dem HLA-Typ B35 scheinen sehr empfänglich für einen schnellen Verlauf der Krankheit zu sein, bei homozygoten Patienten verstärkt sich dieser Effekt [58, 71, 90].

Die MHC-Moleküle für Rhesus-Makaken scheinen polymorpher als die humanen zu sein und werden mit dem Präfix Mamu (*Macaca mulatta*) versehen (Nomenklatur von Klein and Figueroa [97]). Während es beim Menschen jeweils nur einen locus (A-C) pro MHC-I-Molekül gibt, existieren bei Makaken beim Haplotyp A* 1-3 loci bei B* 1-4 loci und kein locus für C. Im Gegensatz zu Menschen, Gorillas und Schimpansen tritt das Phänomen des fehlenden C locus auch bei anderen nicht-menschlichen Primaten auf. Bis jetzt ist nicht bekannt, welcher Genlocus die Aufgaben (Erkennung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) durch Runterregulierung der MHC-Moleküle) für HLA-C bei den Makaken übernimmt. Die Variabilität des Genlocus für die MHC-II-Moleküle (DQ, DP und DR) scheint sich in Kontrast zum MHC-I-Molekül genau umgekehrt zu verhalten, bei Menschen sehr komplex und bei Makaken weniger polymorph. Wie auch beim Menschen wurden einige Studien zum Krankheitsverlauf bezüglich des Haplotyps in Rhesusmakaken durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass Tiere mit dem Haplotyp Mamu-A*11 einen langsameren Verlauf der Krankheit aufwiesen [56, 98, 99] (<http://www.dpz.gwdg.de/genetik/poster/150500.pdf>).

Bei den Schweinsaffen sind nur einige Haplotypen bekannt, diese werden mit dem Präfix Mane (*Macaca nemstrina*) versehen. Die bekannten MHC-II-Moleküle sind Mane-DRB*01 bis *05 [100] und die bislang veröffentlichten MHC-I-Moleküle sind diverse Mane-A*, Mane-B* und Mane-E* [101, 102].

Der Genlocus sowie MHC-Moleküle der Afrikanischen Grünen Meerkatze (AGM) sind bislang noch nicht bekannt.

1.2.4 Pathogenese der HIV/SIV Infektion



Abb. 9: Photos verschiedener Primatenspezies in natürlicher Umgebung

A: *Macaca mulatta*; http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Rhesus_Macaques.jpg

B: *Chlorocebus aethiops*; http://animals.nationalgeographic.com/animals/photos/monkeys/vervet-monkey_image.html

C: *Macaca nemestrina*; <http://www.is-naturfotografie.de/>

Eine Infektion mit Immundefizienzviren verläuft im nicht-natürlichen Wirt (HIV-Infektion im Menschen, SIVmac-Infektion bei *M. mulatta*; Abb. 9A) gänzlich verschieden zum natürlichen Wirt (Tab. 1). Im nicht-natürlichen Wirt treten nach einem Jahr (SIVmac-Infektion bei *M. mulatta*) bis 10 Jahren (HIV-Infektion im Menschen) AIDS-Symptome auf (Depletion von $CD4^+$ -Lymphozyten, Zerstörung der Lymphknoten, opportunistische Infektionen), die letztendlich zum Tod führen. Der natürliche Wirt hingegen bleibt trotz gleicher Viruslast wie in nicht-natürlichen Wirten von der Infektion bis ins hohe Alter unbeschadet [103, 104, 105, 106] und lebt mit dem Virus sozusagen in Koexistenz. Mittlerweile sind über 30 verschiedene Primatenspezies bekannt, die endemisch mit ihren eigenen SIV-Stämmen infiziert sind [36, 107] (Tabelle 1).

Vor einigen Jahren wurde festgestellt, dass den AGM (*Chlorocebus aethiops*; Abb. 9B) eine anti-Gag Antikörperreaktion fehlt [106], wohingegen mit gleichem Virus infizierte Schweinsaffen (*Macaca Nemestrina*; Abb. 9C) eine starke Reaktion ausbilden [108, 109]. Dies impliziert einen Status der Immuntoleranz bezüglich SIVagm Gag in AGM. In vielen anderen natürlichen Wirten (Sootymangabeys, Red-capped-mangabeys, L'hoest Monkeys) wurde solch eine vermeintliche Toleranz gegen Gag gefunden, was darauf hindeutet, dass dies einem gemeinsamen Mechanismus zu Grunde liegt. Das heißt, dass gegen ein sehr früh gebildetes und zahlreich vorhandenes Protein keine Immunantwort aufgebaut wird.

In einigen *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass die gleichen simianen Viren in nicht-natürlichen Wirten AIDS verursachen (HIV-1, HIV-2, SIVmac etc) [38, 108, 109]. So verursacht beispielsweise auch SIVagm in Schweinsaffen (*M. nemestrina*) simiane AIDS-ähnliche Symptome, wohingegen in AGM bei Infektion mit dem gleichen Virus keinerlei Krankheitssymptome auftreten. In der nachfolgenden Tabelle sind simiane Immundefizienzviren in ihren natürlichen

und nicht-natürlichen Wirten sowie eine Zusammenfassung der Replikationsmöglichkeit der Viren in humanen Zellen dargestellt.

Tabelle 1: Einige der SIV und ihre Möglichkeit zur Transmission [35, 44, 110, 111, 112, 113]

Abstammungslinien	Virus	natürlicher Wirt	nicht-natürlicher Wirt	Replikation in humanen	
		apathogen	pathogen	Lymphozyten	Makrophagen
1. SIVcpz	SIVcpz	Schimpansen	Mensch (HIV-1)	x	x
2. SIVsm	SIVsm	Graue Halsbandmangaben	Mensch (HIV-2), Rhesusaffe (SIVmac), Schweinsaffe, Stummelaffe, Cynomolgusaffe, Schwarze Mangaben	x	x
3. SIVagm	SIVagm	AGM (Vervet, Grivet, Tantalus, Sabeus)	Schweinsaffe	x	x
4. SIVsyk	SIVsyk	Syke's Affe		-	-
5. SIVl'hoest	SIVl'hoest	L'hoest Monkey	Schweinsaffe	x	x
	SIVmnd-1	Mandrill		x	-
	SIVsun	Sun-tailed Monkey	Schweinsaffe	-	-
6. SIVgsn	SIVgsn	Greater Spot-nosed Monkey			
	SIVmus	Mustached Guenon			
	SIVmon	Mona Monkey			
7. SIVcol	SIVcol	Colobus Guereza			
unklassifiziert	SIVmnd-2	Mandrill			
	SIVdeb	De Brazz's Affe			
	SIVrcm	Red-capped Mangabey		x	x
	SIVtal	Gabon Talapoin			
	SIVwrc	Western Red Colobus			
	SIVdrl	Drill			
	SIVolc	Olive Colobus			
	SIVschm	Schmidt's Guenon			

Auch im nicht-natürlichen Wirt Rhesusmakaken gibt es schneller und langsamer progressierende Tiere. Aufgrund einiger Untersuchungen ist dieses Phänomen auch in nicht-humanen Primaten auf die vornehmlich homozygote Verteilung bestimmter Haplotypen zurückzuführen. Beispielsweise stehen die Haplotypen Mamu-A*11 und -B*03, -B*04 sowie -B*17 für einen gemäßigten Verlauf der Krankheit [56, 99, 114].

Wie alle simianen Immundefizienz-Viren der natürlichen Wirte (Tab. 1) hat auch SIVagm das Potential, als mögliches HIV-3 auf die menschliche Population überzuspringen [44].

Des Weiteren wurde festgestellt, dass das Immunsystem bei einer HIV-Infektion im Menschen bzw. SIVmac-Infektion in Rhesusmakaken hyperaktiviert ist. Im natürlichen Wirt hingegen konnte kein höherer Aktivierungszustand von CD4⁺T-Zellen (Koexpression von HLA-DR auf CD4⁺-

T-Zellen) detektiert werden, weder bei einer SIVagm-Infektion in den AGM noch bei einer SIVsm-Infektion in den Halsbandmangaben [115, 116, 117]. Möglicher Weise wird das stetig durch Immundefizienzviren aktivierte Immunsystem in nicht-natürlichen Wirten ausgezehrt und bricht dadurch letztendlich vollständig zusammen.

1.3 Impfstoffstrategie gegen HIV

Die Möglichkeit, die HIV-Pandemie durch die Entwicklung eines effektiven und sicheren Impfstoffes einzudämmen, scheitert derzeit an der Andersartigkeit der Biologie von HIV gegenüber anderen Viren wie Masern oder Influenza. Gegen diese Viren konnten erfolgreich Impfstoffe generiert werden. Die Masernschutzimpfung ist ein attenuierter Lebendimpfstoff und die Influenza-schutzimpfung beruht auf einem inaktivierten und gespaltenen Proteinimpfstoff [118], bei HIV gelang das selbst nach über 20-jähriger Aktiv-Forschung noch nicht.

1.3.1 Das Modellsystem SIV im Tier

HIV ist nicht in der Lage andere Spezies als den Menschen zu infizieren, wodurch es als Agens für Impfstoff- und Therapeutika-Studien wegfällt. Schimpansen lassen sich zwar mit HIV-1 experimentell infizieren, dies ist aber meist schwerlich und ohne Pathogenese [119]. Die Infektion von Rhesus und Cynomolgus Makaken mit SIVmac ist das am weitesten verbreitete Modellsystem für HIV, da SIVmac in einem nicht-natürlichen Wirtssystem beobachtet werden kann und sich nach kurzer Zeit simiane AIDS-Symptome einstellen. Die erstmalig beobachtete Infektion von Rhesusmakaken erfolgte versehentlich, da die auf natürliche Weise infizierten grauen Halsbandmangaben mit den asiatischen Rhesusaffen zusammen gehalten wurden und so eine Übertragung von SIVsm (im Rhesusaffen als SIVmac bezeichnet) möglich war. Das so gefundene Pendant zu HIV im Menschen dient seitdem als Modellsystem. Die mit HIV-Infektionen im Menschen vergleichbare Pathogenese erfolgt allerdings bei Rhesusaffen sehr viel schneller, so dass schon nach sechs Monaten Krankheitssymptome auftreten können (persönliche Mitteilung Dr. S. Norley).

Da Tierschutz- und Sicherheitsrichtlinien die Haltung dieser nichtmenschlichen Primaten stark beschränken, wird so auch die Anzahl und Größe der Studien limitiert und ein anderes Modellsystem wünschenswert.

Die schnelle Evaluierung von HIV-Therapeutika scheitert an HIV-empfindlichen kleinen Versuchstieren, die leicht zu handhaben und zu halten sind. Zumindest im Hinblick auf dieses Defizit könnte durch die Generierung von Sprague-Dawley Inzuchtratten, die den HIV-1 Rezeptorkomplex (humane CD4- und CCR5-Rezeptoren) auf T-Zellen und Makrophagen exprimieren, ein gro-

ßer Fortschritt erfolgt sein. Mit diesen Tieren ließen sich Medikamente zur HIV-Therapie schneller testen, die den Viruseintritt oder die Reverse Transkription blockieren, ohne auf Xenotransplantate mit humanen hämatopoetischen Zellen oder Geweben in immundefizienten Mäusen zurückgreifen zu müssen [120]. Soll die Immunantwort charakterisiert oder HIV-Impfstoffe getestet werden, kann im Moment nur auf das SIV-Modellsystem in verschiedenen Primatenspezies zurückgegriffen werden.

1.3.2 Entwicklung von AIDS Impfstoffen

Die direkten Kosten für die HAART-Therapie eines Patienten in Europa belaufen sich auf etwa 20.000-30.000 Euro pro Jahr [121, 122]. Selbst eine Kombination von Generika senkt die Kosten für die vor allem betroffenen armen Länder in Afrika nur auf 1 Dollar pro Tag, was für den größten Teil der dortigen Bevölkerung nicht tragbar ist [123]. Demzufolge hat die überwiegende Mehrheit der HIV-Infizierten nur unzureichenden oder überhaupt keinen Zugang zu dieser Therapie. Die Suche nach einem Impfstoff muss weiterhin vorangetrieben werden, da weder antiretrovirale Therapien noch Anstrengungen des öffentlichen Gesundheitswesens zur Verminderung des Risikoverhaltens es bislang vermochten, die weltweite Ausbreitung von HIV/AIDS einzudämmen. Uganda konnte regional eindrucksvoll beweisen, dass Aufklärungs- und Präventionskampagnen sehr wohl zu einer Verminderung der Infektionsrate führen können. Durch das ABC-Programm („Abstinence - Be faithful - Condom usage“, dt.: Abstinenz - Treue - Kondomgebrauch) konnte die Infektionsrate von 30 % auf 6 % gesenkt werden (<http://www.avert.org/aidsuganda.htm>). Die global aktuell durchgeführten HIV-Impfstoffstudien sind im IAVI-Report 2007 (Internationale AIDS Vakzin Initiative mit Sitz in New York) zusammengestellt.

Effektivität und Sicherheit sind die hauptsächlichen Anforderungen an ein Vakzin. Für HIV hieße das, dass der HIV-Impfstoff nach wenigen Impfungen eine Immunität verleihen (Eliminierung aller eingedrungen Viren und keine Möglichkeit für HIV Reservoirs zu bilden) und sicheren Schutz vor mehreren HIV-Typen bieten müsste. Wünschenswert wären zudem eine gute Applizierbarkeit (per Injektion oder als Schluckimpfung), eine lange Lagerfähigkeit selbst bei höheren Temperaturen (beispielsweise für die ungenügende Kühlung in unterversorgten afrikanischen Endemiegebieten) sowie eine kostengünstige Produktion.

Die traditionellen Impfstoffe wie lebend, attenuierte Viren (aufgrund der Integration ins Genom), inaktivierte Viren und rekombinante Proteine (beide letztgenannten zeigen Limitierungen auf bestimmte Virussubtypen) zeigten sich bei HIV mit seiner einzigartigen Biologie nicht sehr geeignet, eine breite und dauerhafte Immunität im Organismus zu etablieren [118].

Lebend, attenuierte Viren erzielten bei Masern, Polio und Hühnerpocken eine stabile Immunität. Bei HIV allerdings resultierte die versehentliche Verbreitung des attenuierten Virus (Δ nef-HIV-1-Deletionsmutante in der Sydney Blood Bank Cohort) [124] trotzdem in einem pathogenen Verlauf der Infektion, wie auch in Rhesusmakaken gezeigt [125]. Bei Immundefizienzviren ist es bisher nicht möglich, eine hohe Replikation des attenuierten HI-Virus zu erreichen, die wahrscheinlich nötig für eine schützende Immunität ist und gleichzeitig die Pathogenität des Virus zu eliminieren. Ein weiteres Problem bei der Verwendung attenuierter Retroviren besteht darin, dass es aufgrund der hohen Mutationsrate zur Reversion des persistierenden Virus in die pathogene Wildtypform kommen kann, wenn nur kleine Sequenzänderungen zur Apathogenität führten [126]. Die Reversion der Δ nef-HIV-1-Deletionsmutante zum Wildtypvirus kann hier allerdings ausgeschlossen werden, da die Deletion eines so großen Genabschnitts durch Mutationen nicht wieder eingefügt werden kann. Des Weiteren integrieren Retroviren in das Genom ihrer Wirtszelle und können so Insertionsmutagenesen hervorrufen.

In Rhesusmakaken durchgeführte Versuche ließen anfangs den Schluss zu, dass inaktivierte Viren einen Schutz vor Infektion vermitteln. Allerdings wurde später herausgefunden, dass dieser Schutz auf eine Reaktion gegen zelluläre humane Proteine beruht und nicht auf das Virus selbst. Abgesehen davon limitiert die Verwendung von inaktivierten Viren das Spektrum von neutralisierenden Antikörpern auf das Immunisierungsvirus und schließt die Immunantwort der CTL aus [127, 128].

Der noch heute beim Menschen verwendete Hepatitis B Impfstoff ist ein erfolgreiches Vakzin, bestehend aus rekombinantem Protein. Allerdings führte die Verimpfung von rekombinantem HIV-Hüllprotein bei Schimpansen nur zu einem moderaten Titer neutralisierender Antikörper mit limitiertem HIV-Spektrum, der auch nur dann auftrat, wenn Impfstoffprotein und Infektionsvirus die gleiche Sequenz im Hüllprotein auswiesen [129]. Versuche im SIV/Rhesusaffenmodell zeigten, dass zwar hohe Titer HIV-neutralisierender Antikörper gebildet wurden, ein Infektionsschutz gegen SIV aber ausblieb [130]. Außerdem wurden, wie auch bei klinischen Versuchen im Menschen, die zytotoxischen T-Zellen nicht angesprochen.

Es scheint beim Impfstoff gegen Immundefizienzviren eine Voraussetzung zu sein, dass die humorale sowie die zelluläre Immunantwort gleichzeitig angesprochen wird, beides wird durch modernes Impfstoff-Design, wie DNA-Impfstoffe und lebend-rekombinante Vakzine, realisiert.

Die Vakzinierung mit nackter DNA ist eine einfache, jedoch sehr effektive Immunisierungsmethode. Diese kombiniert zahlreiche Vorteile, wie die lange Haltbarkeit, geringe Herstellungskosten und eine leichte Applikation, mit einer robusten T-Zell-Antwort. Durch die fehlende Vektor-Immunantwort wird diese Methode oft als „Prime“ in einer „Prime-Boost“-Strategie benutzt

[131]. Durch Immunisierung mit DNA-Vakzinen konnte gezeigt werden, dass intramuskulär injizierte DNA in Kombination mit Immunomodulatoren (Zytokinen) und Adjuvantien eine starke zelluläre Immunantwort vier Wochen nach Prime-Immunisierung in Rhesusmakaken auslöst [132].

Die lebend-rekombinanten Impfstoffe bestehen aus dem oder den interessierenden HIV-Gen(en), eingebettet in einen lebenden, replikationsfähigen Mikroorganismus, der als Träger für die Gene dient. Nach Infektion mit dem Mikroorganismus entwickelt der Körper eine Immunantwort humoraler und zellulärer Art gegen die Vektorgene aber auch gegen das unter Kontrolle eines eukaryontischen Promotors stehende HIV-Gen. Meist wird ein Pocken- (Vaccinia - Kuhpocken, Modified Vaccinia Ankara-Virus (MVA) oder Kanarienvpocken) oder Adeno- bzw. adeno-assoziiertes Virus als Träger verwendet. Vor allem werden durch dieses Vektorsystem die CTLs angesprochen, da durch den Vektor das HIV-Gen intrazellulär gebildet wird und somit für optimale MHC-I-Molekülbindungen zu Verfügung steht [118].

Das Vaccinia-Virus, benutzt um weltweit die Pocken zu eliminieren, kann in immungeschwächten Impflingen eine tödliche Enzephalitis verursachen [133]. Aufgrund dessen kann diese Impfstoffvariante gerade in den unterversorgten Endemiegebieten Afrikas für HIV nicht in Frage kommen. MVA ist ein durch mehrere Passagen eines parenteralen Vaccinia-Stammes auf Hühnerembryofibroblasten erzeugtes Virus, das viele Deletionen aufweist, so dass die Pathogenität eliminiert, aber die Infektiosität und Immunogenität erhalten wurde. In nichtmenschlichen Primaten (*Cynomolgus* Makaken, *Macaca fascicularis*) konnte durch Kombination unterschiedlicher Immunisierungsvektoren (DNA/Semliki-Forest-Virus (SFV)/MVA) mit mehreren SIVmac-Genen und anschließender SIVmac-Infektion gezeigt werden, dass eine starke CTL-Immunantwort ausgebildet wird. Die Viruslast von drei der vier Tiere war bis zu 41 Wochen nach „Challenge“ (dt.: Virusbelastung, Virusinfektion im Tierversuch) unter die Nachweisgrenze gesunken [134]. Die Erzeugung einer sterilen Immunität in Makaken misslang. Mittlerweile ist MVA in einigen Phase I und II Studien zur Boosterimmunisierung im Einsatz und zeigt eine gute Verstärkung der Immunantwort gegen HIV. Die Kanarienvpocken erwiesen sich als limitiert in ihrer Immunogenität bei Versuchen in Menschen [135], allerdings konnte in Phase I und II Studien in Kombination mit rekombinantem Protein als „Boost“ eine HIV-spezifische ADCC generiert werden [136].

Die Adenovirusvektoren wurden ursprünglich für die Gen-Therapie entwickelt und erwiesen sich als sehr immunogen im Maus- und nichthumanen Primatensystem [137, 138, 139, 140]. Das Problem der spezifischen Antikörperbildung gegen frühere Adenovirusinfektionen im Menschen will man umgehen, indem man seltene Serotypen, denen Menschen vor der Immunisierung noch nicht ausgesetzt waren, oder Adenoviren simianen Ursprungs benutzt.

Eine hoffnungsvolle Phase III Studie (Merck V520 STEP Studie) wurde vorzeitig abgebrochen, nachdem bekannt wurde, dass die Gruppe der Impflinge eine höhere Infektionsrate aufwies als die Placebogruppe. Hier wurde ein Adenovirusvektor mit dem Serotyp 5 zur Immunisierung benutzt, der die HIV-1_{CladeB} Proteine Gag, Pol und Nef exprimiert. Für das Fehlschlagen wird die durch den Adenovirusvektor aktivierte Schleimhaut gesehen, die durch den Aktivierungszustand eine höhere Wahrscheinlichkeit der HIV-Aufnahme besitzt [141, 142, 143].

Das schon erwähnte Semliki-Forest-Virus (SFV) gehört ebenso wie das Venezuelanische Equine Enzephalitisvirus zu den Alphaviren, die mit den adeno-assoziierten Viren ein Vektorsystem für die Immunisierung darstellen und oft in Kombination mit anderen Immunisierungsvektoren und -varianten benutzt werden [118]. Bakterielle DNA-Trägersysteme sind beispielsweise das attenuierte Mycobakterium Bacille Calmette-Guerin, attenuierte Salmonella- oder Listeria-Enterica-Stämme [144]. Mittlerweile sind über 13 verschiedene Systeme bekannt, wie Antigene appliziert werden können [94].

Die einzige abgeschlossene Phase III Studie (AIDSVax B/B, Thailand und parallel in einer abgeänderten B/E-Variante in Europa und den USA) mit einem auf gp120 Proteinen verschiedener HIV Subtypen basierenden Impfstoffkandidaten, kam zu dem enttäuschenden, jedoch nicht unerwarteten Ergebnis, dass Impflinge im Mittel keinen verbesserten Schutz gegen eine HIV Infektion gegenüber der Gruppe, der ein Placebo gespritzt wurde, besitzen [139] (AIDSVAX 2003). Eine aktuell laufende Phase III Studie in Thailand nutzt als „Prime“ ALVAC-HIV-vCP1521 und als Boost-Immunisierung AIDSVax B/E, die Ergebnisse werden 2008 erwartet (IAVI-Report 2007).

Der angestrebte HIV-Impfstoff wird wahrscheinlich aus einer Reihe von unterschiedlichen Immunisierungsmodellen zusammengesetzt sein und Kombinationen verschiedenster DNA-Vakzin-Varianten beinhalten. Eine Steigerung der Immunantwort, induziert durch DNA-Vakzine, kann durch Koapplikation von Zytokinengen [145] und Codonoptimierung des Zielgens erfolgen [146].

1.3.3 Codonoptimierung von Genen

Um die Potenz der DNA-Impfstoffe noch zu steigern, kann die Basensequenz durch Codonoptimierung derart modifiziert werden, dass das Zielgen wie ein autologes Gen im Säugetier erscheint. Die häufiger benutzten Basentriplets zur Anlagerung einer Aminosäure sind nach fortschreitender Analyse des menschlichen Genoms und näherer Charakterisierung von stark- bzw. schwach-exprimierten Genen verschiedener Spezies in Tabellen zusammengefasst. Die Benutzung der Basentriplets ähnelt sich in verschiedenen Säugetierarten sehr, zu Bakterien aber differiert sie aufgrund des bakteriellen Protein-Biosynthese-Apparates stark. Letztendlich liegt der

besseren Expression bestimmter Codons die höhere Verfügbarkeit der entsprechenden t-RNAs zu Grunde. Ein Modell zur Codonoptimierung ist die gesteigerte Expression des Grünfluoreszierenden Proteins (GFP, aus der Qualle *Aequorea victoria*) durch die Anpassung an die in Säugetieren oder auch Pflanzen verwendeten Basentriplets. So kann das GFP auch in Säugerzellen in der gleichen Stärke exprimiert werden, wie es für stark exprimierte zelleigene Gene der Fall wäre. Durch die starke Expression des Zielgens wird eine sehr große Menge an endogenem Protein gebildet, welches als Peptid über MHC-I-Moleküle präsentiert wird und somit in einer möglichst starken Induktion der zellulären Immunantwort resultiert. Durch komplette Neubildung des Gens, z.B. durch Fusion von einzelnen Oligomeren [147], können regulatorische oder inhibitorische Sequenzen eliminiert werden. Dies wurde für das Rev-responsive Element (RRE) zur effizienteren Expression von HIV *gag-pol* durchgeführt [148, 149]. Zusätzlich zum RRE sind in HIV weitere inhibitorische Sequenzen beschrieben, die die Stabilität des RNA-Transkripts beeinflussen und sich negativ auf die Expression auswirken. Die Codonoptimierung von HIV-Sequenzen sorgte für eine höhere Expression von Gag-Protein in Säugetierzellen und eine verbesserte Immunogenität im Mäusemodell [146].

1.3.4 Gene Gun Immunisierung

Bei der Immunisierung mittels Gene Gun wurden die Goldpartikel mit unterschiedlichen DNA-Konstrukten beladen, die einzeln oder in Kombinationen eine Immunantwort induzieren. Diese Methode ist als nicht schmerzhaft für die Tiere beschrieben, da die Goldpartikel mikroskopisch klein sind und die Hautschichten durchdringen können. Es konnten bisher keinerlei negative Folgen der Gene Gun Methode beobachtet werden. Soll die humorale Immunantwort in Mäusen gesteigert werden, wird diese Immunisierung maximal viermal im 14 Tage Rhythmus wiederholt. Soll hingegen die zelluläre Immunantwort gesteigert werden, so ist nach Literaturangaben eine einmalige Wiederholung der Immunisierung nach ca. 45 Tagen notwendig [145].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die in natürlichen Wirten bei SIVagm-Infektion nachgewiesene fehlende Immunantwort auf ein früh und zahlreich gebildetes Protein, das Kernprotein Gag, bildet den hauptsächlich zu charakterisierenden Gegenstand dieser Arbeit. Ziel dieses Projektes war es, die immunologischen Grundlagen für die Apathogenität der SIVagm Infektion in den Afrikanischen Grünen Meerkatzen (AGM) näher zu charakterisieren. Es wurde davon ausgegangen, dass die nach Immunisierung der AGM mit SIVagmGag-Protein und anschließender SIVagm-Infektion fehlende Gag-spezifische

anamnestische Immunantwort auf eine fehlende Kreuzerkennung zwischen exogenem injiziertem und endogenem, durch das Virus selbst gebildetem, SIVagmGag zurückgeht. Die anamnestische Immunantwort ist eine kurz nach Infektion charakteristische einsetzende Steigerung der Immunreaktion bei immunisierten Tieren.

Die nähere Charakterisierung wurde erreicht, indem AGM mit SIVagmGag-DNA immunisiert und anschließend mit SIVagm infiziert wurden. Somit sollte der Unterschied in der Proteinprozessierung und -erkennung umgangen und die AGM zur anamnestischen Immunantwort befähigt werden. Um die *in vivo* Produktion von ausreichenden Mengen an SIVagmGag-Protein zu gewährleisten, wurde das *gag* Gen bezüglich des Codongebrauchs für Säugetiere optimiert. Die resultierende Immunantwort sollte durch die Koapplikation von speziesspezifischem *gmcsf* (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor) gesteigert werden. Die parallel mit SIVmacGag-DNA immunisierten und mit SIVmac239 infizierten Rhesusmakaken sollten einen direkten Vergleich zwischen einer apathogen verlaufenden Infektion und einer nicht-natürlichen, AIDS-induzierenden Infektion erlauben. Des Weiteren wurde *in vivo* die Immunogenität und Kreuzreaktivität der Konstrukte durch Immunisierung von AGM mit SIVmacGag-DNA und Rhesusmakaken mit SIVagmGag-DNA überprüft.

Beide codonoptimierten Gene (SIVagmGagCO und SIVmacGagCO) wurden für die Primatenstudie neu generiert und zuvor in Mausstudien auf ihre Immunogenität und Proteinexpression getestet. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, T-Zell-Epitope für SIVagmGag und SIVmacGag in Balb/c und C57Bl/6 Mäusen zu identifizieren sowie eventuell vorhandene T-Zell-Epitope der AGM bzw. Rhesusmakaken zu charakterisieren.

Die vermutliche „Toleranz“ des Immunsystems der AGM gegenüber dem Gag-Protein von SIVagm konnte in einer vorherigen Studie transient durch Immunisierung mit dem SIVagmGag-Protein übergangen werden. Die humorale Immunantwort gegen SIVagmGag blieb von der Infektion mit SIVagm unbeeinflusst und sank schon nach kurzer Zeit wieder ab.

In dieser Studie sollte der Kontakt des Immunsystems mit endogen produziertem Gag-Protein durch DNA Immunisierung in Abwesenheit anderer viraler Gene klären, ob dieses Phänomen (i) eine echte T-Zell-Toleranz gegenüber SIVagmGag darstellt, (ii) auf Unterschiede in der Proteinprozessierung und -erkennung zurückgeht oder (iii) auf eine aktive, spezifische Unterdrückung der anti-SIVagmGag Immunantwort während der natürlichen SIVagm Infektion hinweist. Diese Erkenntnis könnte helfen, das Paradoxon der Apathogenität der SIVagm-Infektion in AGM zu klären, die lebenslang eine hohe Viruslast aufweisen, obwohl das Virus in nicht-natürlichen Wirten pathogen ist. Dies könnte im Umkehrschluss eine Erklärung für den Mechanismus der HIV-Pathogenese im Menschen ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Codonoptimierung der Gene SIVagmGag und SIVmacGag

2.1.1.1 Codon-Gebrauch der Säugetiere

Der degenerierte Aminosäurecode sorgt dafür, dass die einzelnen Aminosäuren durch verschiedene tRNA-Basentriplets gebildet werden können. Die bevorzugte Benutzung von Basentriplets bei Säugetieren ist in Kotsopoulou et al. [148] beschrieben. Dadurch entstehen sehr GC-reiche Sequenzen, die sich teilweise schwer synthetisieren lassen, weshalb man die Sequenz abändern sollte. Bei sechs oder mehr aufeinander folgenden Cytosinen wurde ein anderes Basentriplett verwendet. Um die Aminosäure (meist Prolin – CCC) darzustellen, wurden entweder CCA oder CCT benutzt. Des Weiteren wurde die *NotI*-Schnittstelle an Position 1184 des *gag*-Gens entfernt, um die spätere Klonierung in das Vektorsystem zu vereinfachen. Anhand der erstellten codonoptimierten Sequenz (Abb. 10) wurden 74 Oligomere à 42 Nukleotide mit einem Überhang von 20-22 Nukleotiden bestellt (Anhang I).

2.1.1.2 Fusion der einzelnen Oligonukleotide mittels PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) ist eine *in vitro* Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen kann [150, 151]. Die überlappenden DNA-Abschnitte fusionieren miteinander und die *Taq*-Polymerase füllt die Einzelstränge komplementär auf (Abb. 10).

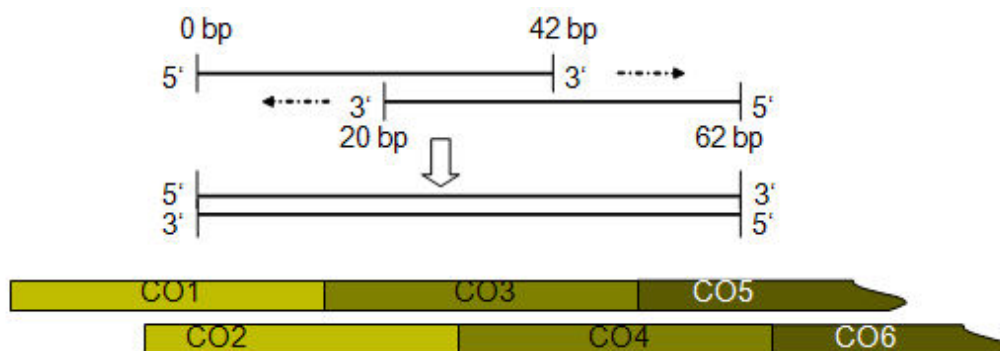


Abb. 10: Schematische Darstellung der Fusionierung von zueinander komplementären Oligomeren

Mittels der Fusions-PCR wurde versucht, die Gesamtsequenz in drei Stücken zu ungefähr 500 bp herzustellen, um nachfolgende Klonierungen zu vereinfachen (Abb. 11). Aus Vorversuchen ergab sich die Notwendigkeit von Mutagenese-PCRs, diese konnten somit parallel durchgeführt werden. Jedes der Fragmente ist jeweils überlappend mit dem(n) anschließenden Fragment(en) und verfügt an diesen Stellen über eine *NotI*-Schnittstelle.

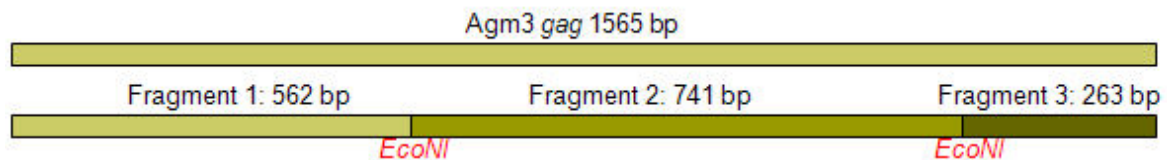


Abb. 11: Schematische Darstellung der Unterteilung des SIVagm3 gag-Genes

Die Fusions-PCR wurde wie in Tabelle 2 und 3 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 2: Pipettierschema für die Komponenten der Fusions-PCR

Substanz	Vol [μ L]
10x PCR-Puffer	5
Oligomer (Plusstrang-CO1,3,5...), 10 μ M	5
Oligomer (Minusstrang-CO2,4,6...), 10 μ M	5
Vorwärts-Primer (erster homologer Sequenzabschnitt im Plusstrang, 10 μ M)	1
Rückwärts-Primer (letzter homologer Sequenzabschnitt im Minusstrang, 10 μ M)	1
dNTPs (je 2,5 μ M)	1
Taq-Polymerase (5 U/ μ L)	2
H ₂ O	30
$\Sigma = 50 \mu$ L	

Tabelle 3: Cyclex-Programm für die Fusions-PCR

Zyklus-Wiederholung	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit
1x	96	2 min
	96	30 s
25x	60	30 s
	72	2 min
1x	72	10 min
1x	4	~
Gesamtdauer: ca. 2 h 20 min		

Nachdem das PCR-Produkt im Hinblick auf die richtige Größe mittels Gelauftrag getestet wurde, konnte das PCR-Produkt in die nächste Fusion-PCR oder mittels TA-TOPO[®]-Klonierung nach Invitrogen in den pCR-TOPO[®]-Vektor eingesetzt und anschließend durch Elektroporation (Gene Pulser, Biorad) in TOP10 *E.coli* (Invitrogen) transformiert werden. Diese elektrokompenten

E.coli besaßen den Genotyp F- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ($\phi 80$ *lacZ* Δ M15 Δ *lacX*74 *recA1 deoR araD139 $\Delta(ara-leu)$ 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*. Nach Transformation wurden die Zellen auf LB_{amp}-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Generierung des codonoptimierten SIVmacGag erfolgte analog.*

2.1.2 Quantifizierung von DNA/RNA

Die Menge von isolierter DNA/RNA wurde spektrometrisch bestimmt. Diese Methode nutzt die unterschiedlichen Absorptionsmaxima von DNA/RNA und Proteinen, um die jeweilige Menge im Eluat zu ermitteln. Dazu wurden die Proben unverdünnt bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm im NanoDrop ND-1000 (Peqlab) gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration an doppelsträngiger DNA diente die Annahme, dass ein Extinktionskoeffizient von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht [152]. Die gemessene Lösung war nicht durch Proteine verunreinigt, wenn der Quotient der optischen Dichte (260 nm / 280 nm) um den Wert 1,8 lag.

2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die in der PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in 0,8-2 % Agarose-Gelen (Agarose, Peqlab) nach ihrer Größe aufgetrennt und sichtbar gemacht. Dabei hing die gewählte Dichte des Agarosegels von der Größe der erwarteten Fragmente ab. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer, in welchem ebenso die Agarose gelöst und das Gel gekocht wurde. Die Proben wurden mit 6x Orange-G-Probenpuffer verdünnt, um in die Geltaschen sinken zu können. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 70-130 Volt und wurde unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm photographiert. Um die Größe der Fragmente zu bestimmen, wurden 100 bp Marker (Ready Load™ 100 bp DNA Ladder, Invitrogen oder GeneRuler 100 bp Plus, Fermentas) benutzt.

2.1.4 Bakterien-Screen mittels Kolonie-PCR

Die über Nacht auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf die richtige Insert-Größe getestet. Eine Bakterienkolonie wurde jeweils in 40 µL dest. Wasser resuspendiert und in die Kolonie-PCR eingesetzt (Tabelle 4 und 5).

Tabelle 4: Pipettierschema für die Komponenten der Kolonie-PCR

Substanz	Vol [μL]
10x Puffer	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (je 2,5 mM)	0,5
DMSO	0,5
Vorwärts-Primer (10 μM)	0,5
Rückwärts-Primer (10 μM)	0,5
Hotstart-Taq-Polymerase (5 U/ μL)	0,125
H ₂ O	15,875
Bakteriensuspension	2,5
$\Sigma = 25 \mu\text{L}$	

Tabelle 5: Cycler-Programm für die Kolonie-PCR

Zyklus-Wiederholung	Temp. [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit
1x	95	15 min
	95	30 s
30x	55	30 s
	72	2 min
1x	72	10 min
1x	4	~
Gesamtdauer: ca. 2 h 20 min		

Bei Feststellung der richtigen Insertgröße wurde für die Plasmid-Isolierung LBamp-Medium mit der Bakteriensuspension angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.5 Plasmid-Isolierung in kleinem und großem Maßstab

Die Plasmid-Isolierung in kleinem (peqGOLD Plasmid Miniprep Kit, Peglab) und großem (EndoFree Plasmid Maxi Kit, Qiagen) Maßstab erfolgte anhand der Protokolle des Herstellers.

2.1.6 Sequenzier-PCR

Diese Sequenzier-PCR wird auch als Abbruch-Reaktion bezeichnet, wobei die Sequenz so lange amplifiziert wird, bis ein ddNTP (Didesoxynukleotid) eingebaut und die Reaktion abgebrochen wird. Die unterschiedlich farbmarkierten ddNTPs befinden sich dann jeweils am Ende des PCR-Produktes, wodurch dann nach Größen-Auftrennung die Sequenz ermittelt werden kann.

Der BigDye Premix wurde von der Firma Perkin-Elmer zur Verfügung gestellt. Nach Ablauf der PCR (Tabelle 6 und 7) wurden die Proben im Sequenzierlabor eingefroren und vom zuständigen Personal durch Gelfiltration aufgereinigt und analysiert.

Tabelle 6: Pipettierschema für die Komponenten der Sequenzier-PCR

Substanz	Vol [μ L]
DNA aus Minipreparation	1
Vorwärts- oder Rückwärts-Primer	1
BigDye Premix	2
Puffer	1
H ₂ O	5
$\Sigma = 10 \mu\text{L}$	

Tabelle 7: Cycler-Programm für die Sequenzier-PCR

Zyklus-Wiederholung	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit
1x	96	2 min
	96	10 s
25x	54	5 s
	60	4 min
1x	4	~
Gesamtdauer: ca. 2 h 20 min		

2.1.7 Zielgerichtete Mutagenese-PCR

2.1.7.1 *FlipFlop[®]-Mutagenese*

Die Mutagenese mittels FlipFlop[®]-Mutagenese Kit basiert auf einem Kit der Firma Bioline, welche den alten Strang mutagenisiert, den neuen Strang mit MHdNTPs (HydroxyMethyl-dNTPs) aufbaut und anschließend den alten Strang aufgrund fehlender MHdNTPs verdaut.

Das Pipettierschema der einzelnen Komponenten für die Mutagenese-PCR und das Cycler-Programm sind in den Tabellen 8 und 9 zu finden.

Tabelle 8: Pipettierschema für die Komponenten der Mutagenese-PCR mittels FlipFlop®

Substanz	Vol [μ L]
10x Reaktionspuffer-Puffer	2,5
5x Q-Solution	5
50 ng DNA des zu mutagenisierenden Plasmids	
vorwärts gerichteter Mutagenese-Primer (10 μ M)	1,5
rückwärts gerichteter Mutagenese-Primer (10 μ M)	1,5
HMdNTP Mix (12 mM)	2,5
Polymerase (5 U/ μ L)	1
Ad 25 μ L mit H ₂ O	

Tabelle 9: Cycler-Programm für die Mutagenese-PCR mittels FlipFlop®

Zyklus-Wiederholung	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit
1x	94	2 min
	94	1 min
10x	50	1 min
	72	1,5 min / Kb
1x	4	~
Zugabe von 1 μ L FlipFlop® Reaktions-Enzym Mix		
	94	1 min
5x	50	1 min
	72	1,5 min / Kb
1x	4	~

Dazu wurden mindestens 30 Nukleotide lange Primer bestellt, welche die zu mutagenisierende Stelle in der Mitte tragen. Nach vollendeter PCR wurde das PCR-Produkt mittels des PCR-Aufreinigungs-Kit der Firma Peqlab von allen störenden Substanzen befreit und durch Elektroporation (Gene Pulser, Biorad) in TOP10 *E.coli* transformiert.

2.1.7.2 Mutagenese nach Stratagene

Die zielgerichtete Mutagenese nach Stratagene basiert auf der Verwendung von mindestens 30 Nukleotiden langen Primern, welche die zu mutagenisierende Stelle in der Mitte tragen. Mittels dieser Primer wurde der Tochterstrang amplifiziert. Aufgrund der Methylierung des Mutterstrangs wurde dieser anschließend durch *DpnI* (Fermentas) verdaut. Nach vollendeter(m) PCR und Verdau wurde das PCR-Produkt mittels des PCR-Aufreinigungs-Kit der Firma Peqlab von allen störenden Substanzen befreit und durch Elektroporation (Gene Pulser, Biorad) in TOP10 *E.coli* transformiert.

Das Pipettierschema der einzelnen Komponenten für die Mutagenese-PCR und das Cycler-Programm sind in den Tabellen 10 und 11 zu finden.

Tabelle 10: Pipettierschema für die Komponenten der Mutagenese-PCR nach Stratagene

Substanz	Vol [μ L]
10x Reaktionspuffer-Puffer	5
5x Q-Solution	10
20 ng DNA des zu mutagenisierenden Plasmids	
vorwärts gerichteter Mutagenese-Primer (10 μ M)	1
rückwärts gerichteter Mutagenese-Primer (10 μ M)	1
dNTP Mix (je 2,5 mM)	1
<i>Pfu</i> -Polymerase (5 U/ μ L)	1
Ad 50 μ L mit H ₂ O	

Tabelle 11: Cycler-Programm für die Mutagenese-PCR nach Stratagene

Zyklus-Wiederholung	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit
1x	95	2 min
	95	30 s
10x	55	1 min
	68	2 min / Kb
1x	4	~

Die Kolonie-PCR, Plasmid-Isolierung und Sequenzier-PCR wurde wie in Abschnitt 2.1.5-2.1.7 durchgeführt und so oft wiederholt bis das Gen in gewünschter Weise vorlag.

2.1.8 Klonierung in den Immunisierungsvektor pTH

Nachdem die vollständig codonoptimierten Gag Gene im pCR-TOPO[®]-Klonierungsvektor vorlagen, wurden mittels PCR an das jeweilige Ende des Gens Schnittstellen für Restriktionsenzyme angefügt, die unterschiedliche Sequenzen schnitten (Tabelle 12 und 13).

Tabelle 12: Pipettierschema für die PCR zum Anfügen von Schnittstellen

Substanz	Vol [μ L]
10x Reaktionspuffer-Puffer	5
Plasmid-DNA des vollständigen korrigierten Gag-Genes	1
vorwärts gerichteter Primer (10 μ M)	1
rückwärts gerichteter Primer (10 μ M)	1
dNTP Mix (je 2,5 mM)	1
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μ L)	1
H ₂ O	40
$\Sigma = 50 \mu$ L	

Tabelle 13: Cycler-Programm für die PCR zum Anfügen von Schnittstellen

Zyklus-Wiederholung	Temp. [°C]	Zeit
1x	95	2 min
30x	95	30 s
	55	1 min
	72	2 min
	72	10 min
1x	4	~
Gesamtdauer: ca. 2 h		

Nach Gelauftrag wurde dieses komplette PCR-Produkt entweder aus dem Gel ausgeschnitten und dann mittels Gel-Extraktionskit (peqGold Gel Extraction Kit, Peglab) extrahiert oder PCR-Aufreinigungskit (peqGold Cycle-Pure Kit, Peglab) aufgereinigt.

Nach anschließendem Verdau mit *HindIII* (Fermentas) und *BamHI* (Fermentas) mit dem angegebenen Puffersystem gemäß Herstellungsangaben wurde das Gen mit dem offenen (mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen) pTH-Vektor (Vektorkarte Anhang IX) durch die *T4*-Ligase (Fermentas) nach folgendem Verhältnis ligiert:

$$Insert[ng] = 10 [x - fache\ zuVektor] * 20\ ng\ Vektor * \frac{Fragmentlänge\ Insert\ [bp]}{Fragmentlänge\ Vektor\ [bp]}$$

Dieser Ligationsansatz wurde nach einer Stunde bei Raumtemperatur (RT) durch Elektroporation (Gene Pulser, Biorad) in TOP10 *E.coli* transformiert.

2.1.9 Isolierung von mRNA aus agmPBMC zur Klonierung von *gmcsf*

Die PBMC von AGM wurden zwei Tage mit Phytohämagglutinin (PHA, Sigma) *in vitro* stimuliert. Die RNA wurde mittels des RNA-Isolierungskits (RNeasy Midi Kit, Qiagen) isoliert und in 10 µL Aliquots bei -80 °C eingefroren.

2.1.10 One-step Reverse Transkriptase-PCR (OneStep RT-PCR)

Unter Verwendung des PCR-Kits (One Step RT-PCR Kit, Qiagen) und der in Villinger et al. [153] angegebenen Primer-Sequenzen wurde die mRNA der AGM in cDNA umgeschrieben und

amplifiziert, wie in Tabelle 14 und 15 beschrieben. Als Positiv-Kontrolle dienten β -Actin-Primer für das β -Actin-Gen, als Negativ-Kontrolle diente destilliertem Wasser.

Tabelle 14: Pipettierschema für den Mastermix der RT-PCR

Substanz	Vol [μ L]
Vorwärts-Primer (10 μ M)	5
Rückwärts-Primer (10 μ M)	5
5x Q-Lösung	10
5x PCR-Puffer	10
dNTPs (je 2,5 mM)	2
Enzym-Mix	2
RNase-Inhibitor	0,5
H ₂ O	5,5
$\Sigma = 40 \mu$ L	

40 μ L dieses Mastermixes wurden zu 10 μ L vorher isolierter und aliquotierter mRNA gegeben.

Tabelle 15: Cycler-Programm für die One-Step RT-PCR

	Zyklus-Wiederholung	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit
Reverse Transkription	1x	50	30 min
Initiations-Denaturierung	1x	95	15 min
Denaturierung		95	30 s
Hybridisierung	40x	54	60 s
Extension		72	2 min
Finale Extension	1x	72	10 min
Kühlung	1x	4	~
Gesamtdauer: ca. 4 h 10 min			

2.1.11 TOPO[®]-Klonierung

Ein erfolgreich amplifiziertes Gen wurde, da im Gel mehrere Banden sichtbar waren, mittels des Gelextraktionskits (Peqlab) extrahiert und in die TA-TOPO[®]-Klonierungs-Reaktion (Invitrogen) nach Herstellerangaben eingesetzt. Anschließend wurde dieser Ansatz durch Elektroporation (Gene Pulser, Biorad) in TOP10 *E.coli* transformiert.

2.1.12 Isolierung viraler RNA aus Plasma

Zur Bestimmung der Viruslast im Plasma wurde eine Isolierung viraler RNA aus Plasma nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (High Pure Viral RNA Kit, Roche). Aus 200 μ L eingesetztem Citrat-Plasma wurden 50 μ L RNA in Wasser eluiert.

2.1.13 Isolierung genomischer DNA aus PBMC

Zur Bestimmung der Proviruslast wurde eine Isolierung genomischer DNA aus PBMC nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (DNA Blood Kit, Qiagen). Aus 5×10^5 eingesetzten PBMC wurden 200 μ l genomische DNA in Wasser eluiert.

2.1.14 Bestimmung der Plasma- und Proviruslast mittels realtime-PCR

Die Bestimmung der Plasma- sowie Proviruslast erfolgte mittels quantitativer Taqman®-PCR im MX4000 real time PCR System (Stratagene) und den Komponenten für die QuantiFast®-PCR (Qiagen) mit folgenden Primern:

SIVagm-Primerset (5'-3'): AGM-VS: FAM-AAG TGT GTC ATA CTA CAG TGC CGT GGA-3BHQ_1
 AGM-VF: TCA GGC ACG GCT AAA TTC TT
 AGM-VR: GCC TCT TCC AAT AGC TCA GT

SIVmac-Primerset (5'-3'): Mac-VS: FAM-CCA ACA GCA CCA TCT AGC GGC AGA GGT-TAMRA
 Mac-VF: CTA GTG GTG GAA ACA GGA ACA
 Mac-VR: TGT TCT CGG GCT TAA TGG CA

In den folgenden Tabellen sind die Pipettierschemata angegeben:

Tabelle 16: Pipettierschema für den Mastermix der quantitativen QuantiFast®-RT-PCR

Substanz	Vol [μ L]	Endkon-zentration
Reaction Mix (2x)	12,5	1x
Primer VF (10 μ M)	4	1,6 μ M
Primer VR (10 μ M)	4	1,6 μ M
Sonde VS (10 μ M)	0,5	0,1 μ M
QuantiFast RT Mix (10 mM)	0,25	0,05 mM
Rox Farbstoff (50x)	0,5	1x
Template	3,25	>100 ng

$\Sigma = 25 \mu$ L

Tabelle 17: Pipettierschema für den Mastermix der quantitativen QuantiFast®-PCR

Substanz	Vol [μ L]	Endkonzentration
Reaction Mix (2x)	12,5	1x
Primer VF (10 μ M)	4	1,6 μ M
Primer VR (10 μ M)	4	1,6 μ M
Sonde VS (10 μ M)	0,5	0,1 μ M
Rox Farbstoff (50x)	0,5	1x
Template	3,50	>100 ng
$\Sigma = 25 \mu$ L		

Das Cycler-Programm für die Quantifizierung der Plasmaviruslast ist in Tabelle 18 aufgeführt und wurde durch Weglassen der Reversen Transkription für die Quantifizierung der Proviruslast gekürzt.

Tabelle 18: Cycler-Programm für die quantitative QuantiFast RT-PCR

	Zyklus-Wiederholung	Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit
Reverse Transkription	1x	50	10 min
Initiations-Denaturierung	1x	95	5 min
Denaturierung	45x	95	10 s
Hybridisierung / Extension		60	30 s
Kühlung	1x	4	~
Gesamtdauer: ca. 1 h 30 min			

Der Cycler für die Quantifizierung von RNA- bzw. DNA-Material detektiert nach jedem Zyklus die sich durch die Amplifikation verstärkende Fluoreszenz, wodurch sich letztlich die initiale Kopienzahl des Templates in einer Probe berechnen lässt. Je weniger Zyklen dabei notwendig sind, um ein Fluoreszenzsignal über einem festgelegten Schwellenwert zu generieren, desto größer ist die initiale Kopienzahl. Während der PCR-Reaktion kommt es durch eine Halogenlampe zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs Rox. Die Emission zwischen 500 nm und 660 nm wird im Anschluss an jeden Annealing-/Extensions-Schritt gemessen.

Der Threshold Cycle (CT) gibt den PCR-Zyklus an, bei dem zum ersten Mal ein über der Basislinie liegendes Fluoreszenzsignal gemessen wurde. Anhand der CT-Werte der Standardreihe (Plasmid-DNA von 10^1 - 10^6) kann eine Kurve erstellt werden, mit deren Hilfe die Startkopienzahl in den Proben ermittelt werden kann. Die Detektionsgrenze für ein signifikantes Signal dieser real time RT-PCR liegt bei 100 Kopien.

Durch Erstellung einer Regressionslinie anhand der Standardreihe und Berechnung der Formel dieser Geraden lassen sich die CT-Werte der Proben in die Plasma- bzw. Proviruslast umrechnen.

2.1.15 Genotypisierungs-PCR

Die Genotypisierung wurde anhand der Veröffentlichungen von Muhl [98]; Loffredo [154] und Sauermann [99] durchgeführt. Es wurden 70 ng genomische DNA von Rh 15 pro Reaktion eingesetzt.

2.2 Beschichtung der Schläuche - Herstellung der Gene Gun-Munition

Pro Schlauch wurden 100 µL von der Spermidin-Arbeitslösung zu 25 µg 1.0 micron Gold gegeben, gut durchmischt und für 3-5 s im Ultraschallbad gelöst. Zu der Gold-Spermidin-Suspension wurden bei Verwendung eines Plasmids für Maustierversuche 50 µg und bei Koimmobilisierung zweier Plasmide jeweils 35 µg DNA gegeben (bei Primatenterversuchen jeweils 100 µg der Plasmide) und für 5 s im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurden beim Vortexen (Stufe 3-4) 100 µL 1 M Calciumchlorid-Lösung tropfenweise zugegeben und diese Suspension 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgefäß 15 s zentrifugiert, der klare Überstand verworfen und das Pellet 3x mit jeweils 1 ml wasserfreiem Ethanol (100 %) gewaschen, dabei immer gevortext, kurz ins Ultraschallbad gestellt und abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 200 µL PVP-Arbeitslösung resuspendiert und in ein 15 mL Falconröhrchen überführt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß solange mit 200 µL PVP-Arbeitslösung nachgewaschen und ebenfalls überführt, bis sich 3 ml PVP-Arbeitslösung und nahezu das gesamte Gold im 15 ml Falconröhrchen befand.

Nach 10-15minütiger Trocknung des Schlauchs durch Durchleiten von 3-4 L/min Stickstoff wurde die Gold-DNA Suspension mit Hilfe der Spritze in den Schlauch aufgezogen, in die Präparations-Apparatur gespannt und 5 min inkubiert. Das Ethanol wurde anschließend mit der Spritze abgezogen und die klare Flüssigkeit zum Überprüfen der verlorengegangenen Goldmenge im Falcon aufgefangen. Sobald die Flüssigkeit aus dem Schlauch entnommen war, wurde dieser sofort um 180° gedreht und 30 s inkubiert. Danach wurde der Schlauch weitere 5 min gedreht, wobei nach 30 sec Stickstoff-Durchfluss hinzukam. Abschließend wurde der Schlauch ausgespannt, zugeschnitten und bei 4 °C im 50 mL Falcon mit Parafilm verschlossen gelagert.

2.3 Immunisierung der Mäuse

2.3.1 Tiere

Die Balb/c- und C57Bl/6-Mäuse wurden im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Marienfelde gezüchtet und nach Lieferung mindestens eine Woche in den Räumen des RKI- Tierbereichs akklimatisiert. Die Haltung erfolgte in Käfigen des Typs III mit bis zu 10 Tieren pro Kasten im 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus. Die Unterbringung, Pflege und Begutachtung des Gesundheitszustandes der Tiere wurde durch das Personal des Tierbereiches und durch die Experimentatoren gewährleistet und entsprach den staatlichen und institutionellen Tierschutzrichtlinien.

2.3.2 Immunisierungsstrategie und -schema

Für die Prä-Immun Blutabnahme durch Punktion des Retrobulbär-Komplexes ein oder zwei Tage vor der eigentlichen Immunisierung wurden die Tiere durch das Inhalationsbetäubungsmittel „IsoFlo Vet“ (Schering-Plough Animal Health) kurzzeitig narkotisiert.

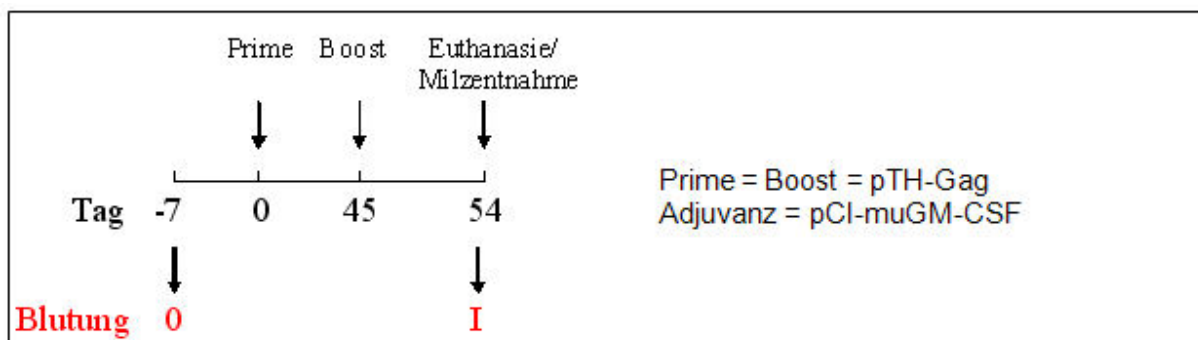


Abb. 12: Immunisierungsschema der Balb/c- und C57Bl/6-Mäusen

Die Immunisierung erfolgte durch Einbringen von DNA-beladenen Goldpartikeln mittels der Gene Gun Methode in die oberen Hautschichten und nach angegebenem Immunisierungsschema (Abb. 12). Um eine sichere Applikation zu gewährleisten und eine übermäßige Belastung durch die laute Entladung zu vermeiden, wurden die Tiere durch Inhalationsnarkose (s.o.) für wenige Minuten betäubt. Danach wurde die Bauchdecke der Tiere mittels eines Elektrorasierers rasiert und der Abstandshalter der Gene-Gun leicht aufgesetzt. Jedes Tier wurde mit zwei örtlich voneinander getrennten Applikationen behandelt. Die Tiere wurden bei Abschluss der Studien zum Zweck der Milzentnahme narkotisiert und per Zervikaldislokation getötet.

2.4 Immunisierung und Belastung der Primaten

2.4.1 Tiere

Jeweils 12 adulte Tiere (2-24 Jahre alt, beiderlei Geschlechts) der Gattung *Chlorocebus aethiops* und *Macaca mulatta* wurden für diese Studie ausgewählt (siehe Tabelle 19). Die Züchtung, Haltung und Behandlung erfolgte im Paul-Ehrlich-Institut (Langen, Deutschland) durch das dortige Personal in Übereinstimmung mit den bestehenden Tierschutzbestimmungen. Alle nichthumanen Primaten waren vor Beginn der Studie seronegativ für SIVagm, SIVmac, simianes Typ D Retrovirus (SRV), simianes T-Zell Leukämie Virus (STLV) und simianes Herpes B Virus. Sie zeigten darüber hinaus keine T-Zellantworten für SIV Antigene. Die Tiere wurden regelmäßig medizinisch untersucht. Die Immunisierungen und die Blutentnahmen erfolgten unter Betäubung mit Ketamin/Xylazin-Injektionsnarkose mittels Blasrohrpfeil (10 mg/kg Körpergewicht i.m.) vor der morgendlichen Fütterung. Dabei wurden zusätzlich das Körpergewicht sowie die Körpertemperatur gemessen und das allgemeine Befinden durch den Tierarzt begutachtet.

Tabelle 19: Übersicht der Primaten im Versuch

Spezies	Immunisierungs-DNA	Primatennummer #		Geburtsdatum	Gewicht [kg] (20.09.2007)
		extern	intern		
<i>Chlorocebus aethiops</i> Afrikanische Grüne Meerkatze (AGM)	pTH-SIVagmGagCO + pTH-agmGMCSF	AGM B1m	1	ca.1987	5,00
		AGM 93 m	2	1983	4,98
		AGM 347 m	3	20.02.05	2,50
		AGM 168 m	4	24.04.93	6,90
	pTH-SIVmacGagCO + pTH-agmGMCSF	AGM B15 m	5	nicht bekannt	6,60
		AGM 338m	6	15.09.03	3,70
		AGM 341m	7	10.11.03	2,40
		AGM 249 m	8	30.05.97	5,70
	pTH-empty + pTH-agmGMCSF	AGM 189 m	9	13.09.93	7,90
		AGM 332m	10	13.04.03	7,80
		AGM 268 m	11	10.10.98	4,50
		AGM 327 m	12	03.01.03	4,60
<i>Macaca mulatta</i> Rhesusmakaken (Rh)	pTH-SIVagmGagCO + pTH-rhGMCSF	RH 301 m	13	ca.Jan 2001	10,30
		RH 58405w	14	03.04.92	9,10
		RH 319 w	15	26.06.02	6,30
		RH 58411w	16	21.04.93	10,55
	pTH-SIVmacGagCO + pTH-rhGMCSF	RH 306m	17	14.07.01	11,30
		RH 58403w	18	24.03.93	7,40
		RH 918w	19	27.01.91	5,20
		RH 58414w	20	15.03.93	5,80
	pTH-empty + pTH-rhGMCSF	RH 58406w	21	16.06.93	8,60
		RH 58407w	22	15.03.93	11,05
		RH 916w	23	18.04.93	7,00
		RH 58415w	24	18.04.93	8,75

Die Gruppenstärke von je vier Tieren pro Gruppe ergibt sich aus der zu erwartenden Schwankung der Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher genetischer Prädisposition, der unterschiedlichen Physiologie der einzelnen Tiere und der leichten Abweichungen durch die Verabreichungsmethoden der Immunogene.

2.4.2 Immunisierungsstrategie und –schema

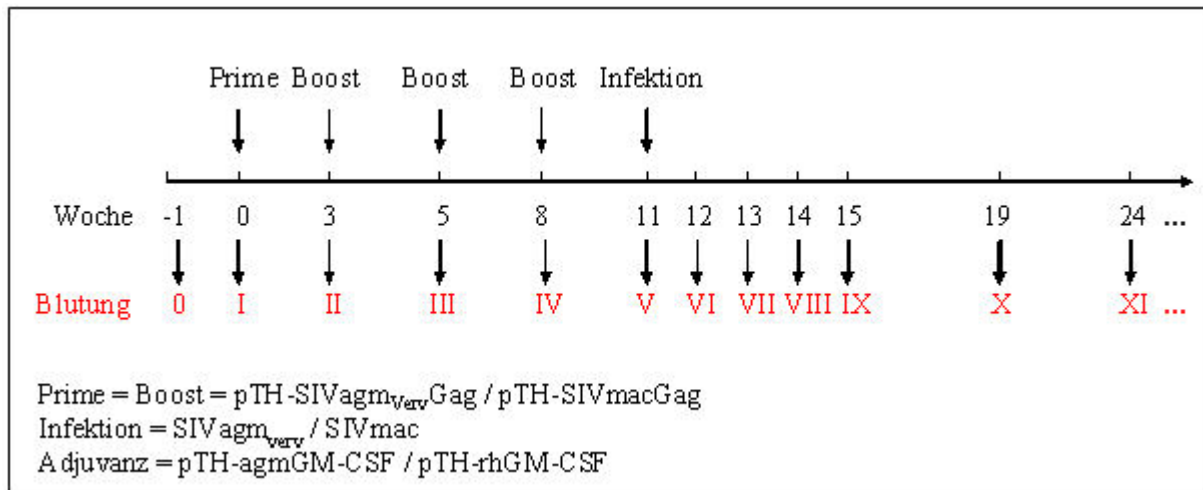


Abb. 13: Immunisierungsstrategie

Die Immunisierungsstrategie (Abb. 13) beinhaltete eine viermalige Immunisierung pro Tier im Abstand von drei Wochen mit anschließender Infektion mit SIVagm bzw. SIVmac. Die Anzahl der Immunisierungen war abhängig von der Immunantwort, gemessen in der 6. Woche. Die benötigten Blutentnahmen erfolgten zwei Wochen vor der ersten Immunisierung und dann jeweils zeitgleich mit den Immunisierungen bzw. der Virusbelastung. Hierzu wurden die Tiere mit einer Ketamin/Xylazin-Injektionsnarkose mittels Blasrohrpfeil narkotisiert. Die Vena femoralis wurde in der Leiste mit Hilfe des Vacutainer®-Systems punktiert und das Blut steril aufgefangen. Bis vier Wochen nach Infektion wurde wöchentlich Blut abgenommen, danach alle vier Wochen.

In Tabelle 20 ist die applizierte DNA-Menge pro Immunisierung detailliert aufgeführt. Die Tiere erhielten pro Immunisierung jeweils insgesamt 32 µg des Immunisierungsvektors (pTH-SIVagmGag bzw. pTH-SIVmacGag) in Kombination mit jeweils 32 µg des Immunomodulators (pTH-agmGMCSF bzw. pTH-rhGMCSF). Die maximale DNA-Menge, die auf 0,5 mg Gold immobilisiert werden kann, entspricht ca. 4 µg DNA. Deshalb war es nur möglich, den Tieren 2 µg Immunisierungsvektor plus 2 µg Immunomodulator pro Schuss zu verabreichen. Die Tiere der Vektor Kontrollgruppe (s.o.) erhielten jeweils die entsprechende Gesamtmenge der Vektorkontrolle (pTH-empty) plus der entsprechenden Menge an Immunomodulator. Des Weiteren erhielt

jeweils ein Tier jeder Gruppe zusätzlich 32 µg pTH-OVA mit weiteren 32 µg des Immunmodulators als interne Kontrolle.

Tabelle 20: DNA-Menge pro Immunisierung

Gruppe	Spezies	pTH-SIVagmGagCO	pTH-SIVmacGagCO	pTH-empty	pTH-agmGMCSF	pTH-rhGMCSF	pTH-OVA	DNAses	Infektion mit
		[µg / Immunisierung]							
1	AGM 1	32			32			64	SIVagm _{verv}
	AGM 2	32			32			64	SIVagm _{verv}
	AGM 3	32			32			64	SIVagm _{verv}
	AGM 4	32			64		32	128	SIVagm _{verv}
2	AGM 5		32		32			64	SIVagm _{verv}
	AGM 6		32		32			64	SIVagm _{verv}
	AGM 7		32		32			64	SIVagm _{verv}
	AGM 8		32		64		32	128	SIVagm _{verv}
3	AGM 9			32	32			64	SIVagm _{verv}
	AGM 10			32	32			64	SIVagm _{verv}
	AGM 11			32	32			64	SIVagm _{verv}
	AGM 12			32	64		32	128	SIVagm _{verv}
4	Rhesus 13	32				32		64	SIVmac239
	Rhesus 14	32				32		64	SIVmac239
	Rhesus 15	32				32		64	SIVmac239
	Rhesus 16	32				64	32	128	SIVmac239
5	Rhesus 17		32			32		64	SIVmac239
	Rhesus 18		32			32		64	SIVmac239
	Rhesus 19		32			32		64	SIVmac239
	Rhesus 20		32			64	32	128	SIVmac239
6	Rhesus 21			32		32		64	SIVmac239
	Rhesus 22			32		32		64	SIVmac239
	Rhesus 23			32		32		64	SIVmac239
	Rhesus 24			32		64	32	128	SIVmac239

Die Immunisierungen der Tiere mittels Gene Gun wurden unter Vollnarkose (wie oben beschrieben) durchgeführt und verursachten bei den Tieren nach Einschätzung der zuständigen Tierärzte keinerlei Schmerzen und Angstzustände, jedoch geringe Nachwirkungen in Form von Rötung und Verschorfung an der Applikationsstelle. Die Applikationsstelle auf dem Bauch der Tiere wurde vorher rasiert, um das Einbringen der DNA in die Haut zu gewährleisten. Um die Tiere durch mehrfaches Narkotisieren nicht allzu sehr zu belasten, wurde gleichzeitig Blut entnommen.

2.4.3 Belastung mit SIVagm bzw. SIVmac239

Die Infektion der Tiere erfolgte durch Injektion nach vorheriger Betäubung mittels Blasrohr. Die AGM erhielten jeweils 0,25 ml SIVagm⁺ Plasma infizierter Tiere (gepooltes Plasma von AGM 162 und 163) und die Rhesusmakaken wurden mit titriertem Virusisolat SIVmac239 (MID₅₀ = 5000) infiziert.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zellen und Medien

Exklusive der Transfektion von Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO-Zellen) und HEK293T-Zellen (293T-Zellen) wurden für die einzelnen Versuche Primärzellen der unterschiedlichen Tierarten benutzt. Diese wurden entweder frisch isoliert oder aus dem Flüssigstickstoff entnommen und aufgetaut. Bei allen Versuchen mit Primärzellen wurde RPMI+++ verwendet und bei den Transfektionen von CHO- und 293T-Zellen DMEM und DMEM+++. Zur Virusproduktion wurden C8166-Zellen (eine durch HTLV-1 (Humanes T-Zellleukämievirus) immortalisierte humane CD4⁺-Zelllinie) in RPMI+++-Medium verwendet.

Medien:	RPMI 1640:	Kat.: 51800, Pulver, Gibco BRL
		10 % FKS (Gibco BRL) + 0,8 % NTN-Glutamin (Gibco BRL) + 0,4 % NSP(Neomycin 100 µg/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Pe-nicillin 100 U/ml, Sigma) in RPMI 1640
	RPMI+++:	
	DMEM:	Kat.: 31600-091, Pulver, Gibco BRL
		10 % FKS (Gibco BRL) + 0,8 % NTN-Glutamin (Gibco BRL) + 0,4 % NSP(Neomycin 100 µg/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Penicillin 100 U/ml, Sigma) in DMEM
	DMEM+++:	
	Cryo-SFM:	Kat.: 2040101 serumfreies Einfriermedium (Provitro)
	Fötales Kälber Serum (FKS), Gibco BRL	

2.5.2 Lymphozytenseparation, Plasma- und Serumisolierung

Um periphere, mononukleäre Zellen (PBMC) aus heparinisiertem oder citratisiertem Vollblut zu gewinnen, wurde eine Dichtezentrifugation in Biocoll (Biochrom AG), einer Polysaccharose der Dichte 1.077 g/L oder in CPT-Röhrchen (Blutabnahmeröhrchen gefüllt mit Polysaccharose der Dichte 1.077 g/L, gallertartiges Filtrationsmittel und Citrat; Becton Dickinson) durchgeführt. Im Fall der Biocoll-Trennung wurden 15-25 ml heparinisiertes oder citratisiertes Vollblut auf die Membran eines mit 15 ml Biocoll gefüllten Leucosep-Röhrchen (Greiner) pipettiert und für 20 min bei 1000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund ihrer höheren Dichte wanderten durch die Zentrifugation die Erythrozyten und Granulozyten durch die Membran nach unten, während

die PBMC oberhalb der Membran einen weißen Ring im Plasma bildeten. Mit einer Pipette wurde zuerst das Plasma und dann die PBMC abgenommen, in ein neues Falconröhrchen überführt, in PBS resuspendiert und bei 300 x g für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Durch die Benutzung von CPT-Röhrchen konnte man Zeit und andere Verbrauchsmaterialien sparen, da das Blut direkt in die Röhrchen (Fassungsvolumen 8 ml) abgenommen wurde und die CPT-Röhrchen direkt in die Zentrifuge gestellt werden konnten. Nach der Zentrifugation war ein Transport der Proben vom PEI zum RKI per ICE-Kurier möglich. Das PBMC-Plasma-Gemisch wurde in Falconröhrchen überführt und die darin enthaltenen PBMC bei oben angegebenen Bedingungen pelletiert. Anschließend wurde in beiden Fällen, Trennung durch Biocoll und Leucosep-Röhrchen oder durch CPT-Röhrchen, gleich verfahren. Danach wurden die Zellen in 20 ml hypotoner 0,86 %iger Ammoniumchloridlösung (Lösung zur Erythrozytenlyse) aufgenommen und für 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Hierbei lysierten die Erythrozyten, so dass sie bei anschließendem Waschen mit PBS entfernt werden konnten. Die PBMC wurden danach in Medium aufgenommen, und es wurde mittels eines automatischen Zellzählers (Coulter Counter ZM) die Zellzahl bestimmt. Nach der Zentrifugation (700 x g für 10 min mit Bremse) wurden ca. 1×10^7 Zellen/ml in Cryo-SFM Einfriermedium aliquotiert und mit Hilfe von Mr. Freeze (mit Isopropanol gefülltes Behältnis zur langsamen Abkühlung, Nalgene) bei -80 °C eingefroren. Nach 1-2 Tagen wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt.

Des Weiteren wurden 2 Sarstedtröhrchen mit 5×10^5 PBMC gefüllt und bei 3500 x g für 3 min mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets für die spätere Bestimmung der zellulären Viruslast bei -80 °C eingefroren.

Das Plasma wurde für verschiedene Nachweisverfahren weiter aufbereitet. Dazu entfernte man es oberhalb des Lymphozytenrings bzw. -pellets und zentrifugierte es bei 3000 x g für 15 min bei 4 °C, um eventuell noch vorhandene Zellen oder Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde dann in 4 Sarstedtröhrchen zu je 0,5 ml Aliquots für die Bestimmung der plasmaassoziierten Viruslast bei -80 °C und in einem 4 ml Plasmaröhrchen für die Bestimmung des Antikörpertiters bei -20 °C eingefroren. Zur Komplement- und Virusinaktivierung wurde das Plasma infizierter Affen nach dem Auftauen für 20 min bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert bevor es in immunologische Assays eingesetzt wurde.

2.5.3 Vitalfärbung

Die Vitalfärbung wurde dazu benutzt, mit Hilfe von Trypanblau (Sigma) die Vitalität der Zellen zu untersuchen. Trypanblau dringt in tote Zellen ein, diese erscheinen durchgängig blau gefärbt. Die lebenden Zellen bleiben hingegen ungefärbt. Es wurden 10 µL der Zellsuspension mit 10 µL

Trypanblau resuspendiert und 2-5 min inkubiert. Anschließend wurden 10 µL in eine Neubauerzählkammer gegeben und sofort gezählt. Der Prozentsatz an lebenden Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$\text{lebendeZellen}[\%] = \frac{\text{ungefärbteZellen}}{\text{ungefärbteZellen} + \text{gefärbteZellen}} * 100$$

2.5.4 Milzzellisolation und Serumgewinn

Die präparierten murinen Milzen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem sich 500 µL PBS befanden und welches die ganze Zeit über auf Eis gehalten wurde. Die Mausmilzen wurden mit einer Pinzette aus dem Reaktionsgefäß entnommen, mittels eines Stößels über ein Sieb gerieben und anschließend mit 5 ml PBS ausgewaschen. Die verwendeten Materialien waren steril. Pro Immunisierungsgruppe wurde das gleiche Sieb verwendet, welches nach jeder Milz mit 70 %igem Ethanol und PBS gewaschen wurde. Die 5 ml PBS-Milzzellsuspension wurde dann vorsichtig in einem 15 ml Falconröhrchen auf 5 ml Histopaque (Sigma) geschichtet und 30 min bei 4 °C und 1500 x g zentrifugiert. Der dabei sichtbar gewordene weiße Zellring wurde dann in ein neues 15 ml Falconröhrchen überführt, mit 15 ml PBS gewaschen und anschließend 10 min bei 4 °C und 1500 x g zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 15 ml PBS resuspendiert und dieses erneut bei gleichen Parametern zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml RPMI+++ Medium resuspendiert und mittels eines automatischen Zellzählers (Coulter Counter ZM) die Zellzahl bestimmt. Die Verwendung des Gerätes erfolgte erst nach Vergleichen von Ergebnissen einer Lebendzellzählung mit der Neubauerzählkammer und dem automatischen Zellzähler.

Bei den Mäusen wurde Serum gewonnen, wobei das Blut über Nacht bei 4 °C gerann und dann in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

2.5.5 Transfektion

Für die Transfektion von CHO- bzw. 293T-Zellen wurden diese in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml in eine Platte mit 6 Vertiefungen (2 ml/Vertiefung) gegeben und 24 h in einem Inkubator mit 95 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C kultiviert. Sobald konfluentes Wachstum auftrat, wurde nach dem Protokoll zur Transfektion mit Polyfect (Qiagen) verfahren. Nach 48 Stunden wurde der Überstand abgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden dann vorsichtig mit PBS gewaschen, wobei das PBS wieder vollständig

entfernt wurde. Des Weiteren wurden 100 μ L Lysispuffer auf die Zellen gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden anschließend die Zellen vom Boden der Platte abgekratzt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Proben im Überkopfschüttler 20 min bei 4°C aufgetaut und dann 20 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Die Überstände der Transfektion und Zelllysate wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren oder konnten direkt in die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt werden.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (SDS: engl.: Sodiumdodecylsulfat; dt.: Natriumdodecylsulfat) wurde, wie in Sambrook et al. [152] beschrieben, verwendet, um eine Proteingrößenbestimmung durchzuführen. Die Komponenten des Trenngels sowie des Sammelgels sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Tabelle 21: SDS-Gel-Zusammensetzung: die Komponenten reichen für zwei Gele.

Komponenten	Trenngel 12 %	Sammelgel 5 %
Dest. Wasser	6,8 ml	5,7 ml
Acrylamid 30 %	8,0 ml	1,7 ml
1,5 M TRIS pH 8,8	5,0 ml	-
0,5 M TRIS pH 6,8	-	2,5 ml
10 % SDS	200 μ L	100 μ L
10 % APS	140 μ L	70 μ L
TEMED	10 μ L	5 μ L

Die Proben (Zelllysat- und Transfektions-Überstand) wurden 1:2 mit DNA-Probenpuffer verdünnt und 10 min bei $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekocht. Dann konnten die Proben und der Größenmarker (Precision Plus Protein Prestained Standard, BioRad) aufgetragen, die Power Supply 10 min auf 100 Volt eingestellt und später dann für ca. 40 min auf 180 Volt hochgestellt werden. Nach erfolgtem Elektrophoreselauf wurden die Glasscheiben aus der Kammer herausgenommen und mittels eines Skalpell von einander getrennt.

Um das Gel zu färben, wurde dieses für eine Stunde in die Färbelösung eingelegt und bei RT und 50 rpm geschwenkt. Anschließend wurde das Gel durch mehrfachen Wasserwechsel über Nacht gewaschen. Nun wurde das Gel entweder mit Weißlicht photographiert oder zwischen zwei Einweckfolien zirka einen Tag lang an der Luft getrocknet.

2.6.2 Westernblot

Der Westernblot wurde verwendet, um die Proteine aufgrund von Antikörperwechselwirkungen näher zu charakterisieren. Es wurde wie in Sambrook et al. [152] beschrieben gearbeitet. Der erste Antikörper, gerichtet gegen das gesuchte Protein, wurde in Blockingpuffer verdünnt, und über Nacht (4°C, 50 rpm) inkubiert. Der Sekundär-Antikörper, gerichtet gegen den konstanten Teil des ersten Antikörpers (meist ein Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugierter anti-IgG Antikörper), wurde zur Inkubation für eine Stunde bei RT und 50 rpm auf die Membran gegeben. Die Zusammensetzung der verwendeten Substratlösung ist in Abschnitt 2.8.2 angegeben.

2.7 Immunologische Methoden

2.7.1 Nachweis von SIV-spezifischen Antikörpern: SIVagm- / SIVmac-ELISA

Dieser Test dient der semiquantitativen Bestimmung spezifischer Antikörper gegen retrovirale Proteine in Plasmaproben. Die Methode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung, die mittels Peroxidase-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen wird.

Die Herstellung des Antigens erfolgte aus Zellkulturüberständen von SIVagm bzw. SIVmac infizierten C8166-Zellen. Ungefähr 3 L Zellkulturüberstand wurden in einer Ultrazentrifuge (Beckmann, Rotor 19) bei 4°C für 30 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Aus diesem Überstand wurden durch eine weitere Ultrazentrifugation für 2,5 h bei 18.000 rpm und 4°C Viruspartikel pelletiert. Das Viruspellet wurde über Nacht auf Eis gestellt und am nächsten Tag gesammelt. Um noch vorhandene Zelltrümmer zu entfernen, wurde das resuspendierte Viruspellet auf ein Sucrosekissen, dessen Dichte mit 1,13 g/ml etwas unter der Viruspartikeldichte liegt, geschichtet. Erneut wurde für 1 h zentrifugiert (100.000 g in Beckmann Rotor SW28 bei 4°C). Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, in 200 µl aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Zur Viruslyse wurde das Viruspellet 0,1 %ig mit Nonidet-P40 (Igepal) versetzt und 30 min bei RT inkubiert, anschließend auf 10 ml PBS/0,1 %Tween aufgefüllt.

Um gereinigtes SIVagmGag bzw. SIVmacGag Protein zu erhalten, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Gag-Protein (AG3.0) an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Heidelberg) gekoppelt. Der Antikörper wurde dazu vorab über Nacht in Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, pH 8,3; 0,5 M NaCl) bei 4°C dialysiert und anschließend auf eine Konzentration von 10 mg/ml verdünnt. 5 ml wurden mit 1 g Sepharose eine weitere Nacht bei 4°C inkubiert und nach mehrfachem Waschen mit alternierendem pH-Wert und Resuspendierung in eine Säule überführt. Die 10 ml

Viruslysate wurden auf die Säule gegeben, mit 10 Säulenvolumen PBS/0,1 % Tween gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer (100 mM TRIS-HCl, 100 mM Glycin, 0,5 M NaCl; pH 2,3) eluiert. Das Eluat wurde sofort mit 100 µl 2 M TRIS-HCl (pH 11) neutralisiert. Nach Überprüfung der Fraktionen auf SIVagmGag- bzw. SIVmacGag-Gehalt mittels Antigen-Sandwich-ELISA wurden die positiven Fraktionen vereint und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert (Dialyseschlauch 3500 MW). Das gewonnene Protein wurde im Antigen-Capture-Assay und in der Western-Blot-Analyse getestet.

Das Antigen wurde in optimaler Konzentration (in Vorversuchen titriertes SIVagmGag bzw. SIVmacGag, Richtwert 1 µg/ml oder SIVagm bzw. SIVmac Viruslysat) zunächst in die Vertiefungen einer 96-Well Falcon Microtest III Probind Platte (Becton Dickinson) adsorbiert. Dies erfolgte durch die Verdünnung des Antigens in Wasser, wobei das Endvolumen pro Vertiefung 50 µl betrug. Die Lösung trocknete über Nacht unter Anwendung eines Ventilators ein. Anschließend wurde mit 100 µl pro Loch PBS mit 2 % (w/v) Milchpulver (PM) durch 45-minütiges Inkubieren bei Raumtemperatur blockiert. Die Platten wurden danach dreimal mit je 200 µl pro Loch PBS mit 0,2 % Tween 20 (PT) gewaschen. Die in den Seren enthaltenen spezifischen Antikörper konnten nun an die Wand der Vertiefung binden. Die Seren wurden 1:50 in PM mit 0,1 % Tween 20 (PMT) vorverdünnt und in einem Volumen von 50 µl pro Loch in Duplikaten 1:3 ausverdünnt (insgesamt acht Verdünnungsstufen). Es folgte eine 60 min Inkubation bei 37°C und anschließend ein dreimaliger Waschgang mit 200 µl pro Loch PT. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde ein sekundärer, enzymgekoppelter Antikörper, der sich gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers richtet, eingesetzt. Der Detektionsantikörper (anti-human IgG Peroxidase Konjugat aus der Ziege) wurde 1:1000 in PMT verdünnt und in einem Volumen von 50 µl pro Loch pipetiert. Die Platten wurden anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Substratlösung katalysierte das konjugierte Enzym (Peroxidase) eine Farbreaktion, welche durch Zugabe von 25 µl 2,5 N Schwefelsäure gestoppt wurde. Die Intensität der Färbung verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper und wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im Tecan Sunrise Photospektrometer (Tecan) bestimmt. Negatives Serum wurde zur Bildung des Schwellenwerts (Mittelwert plus 5x Standardabweichung) verwendet.

In der vorliegenden Primaten-Studie wurde dabei nach IgG-Antikörpern in den Plasmaproben gesucht, zum einen gegen Viruslysat und zum anderen gegen aufgereinigtes SIVagmGag bzw. SIVmacGag Protein. Die Mausseren wurden nur auf Antikörper gegen Gesamtviruslysat getestet.

2.7.2 INF γ - ELISpot

Dieser Assay wurde verwendet, um durch Peptide stimulierte T-Zellen zu detektieren und somit zu quantifizieren. Hierbei wurden 96-Loch-Platten (MAIP S45 ELISpot-Platte, Millipore) verwendet, deren Lochböden mit einer Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) beschichtet waren. Während des gesamten Protokolls war darauf zu achten, dass die Platten bis zum Abnehmen der Zellen steril blieben und dass nie der Boden der Vertiefungen berührt wurde, da auftretende Kratzer die Messung und Analyse stören würden. INF γ wird von T-Zellen antigenspezifisch freigesetzt, dient dadurch der Detektion HIV-spezifischer T-Zellen [155, 156] und kann somit als Biomarker in verschiedenen Methoden benutzt werden.

Die Platten wurden einmal mit 70 % Ethanol (15 μ L pro Loch) inkubiert, um die Poren zu vergrößern und die Platten in einen möglichst keimarmen Zustand zu überführen. Nach einminütiger Inkubationszeit wurde der Inhalt der Vertiefungen in eine Wanne ausgeschüttet. Anschließend wurden die Platten 6x mit PBS (200 μ L pro Loch) gewaschen und nach dem letzten Waschgang auf einem sterilen saugfähigen Papier ausgeklopft. Danach wurden sofort 100 μ L eines bereits vorbereiteten Beschichtungs-Antikörpers, gerichtet gegen INF γ (Mab AN18 bzw. GZ-4, Mabtech), in jede Vertiefung gegeben, um ein Austrocknen der Platten zu verhindern. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurde der Inhalt der Platten verworfen, die Platten 6x mit PBS (200 μ L pro Loch) gewaschen und nach dem letzten Waschgang auf sterilem, saugfähigen Papier ausgeklopft. Um die Platten zu blockieren, wurden 100 μ L 0,2 μ m-sterilfiltriertes RPMI+++ Medium in jede Vertiefung gegeben und die Platten für 2 h bei RT inkubiert, danach bis zur Zell-Zugabe bei 4 °C aufbewahrt.

Nach der Isolierung der Mausmilzzellen oder der PBMC nicht-menschlicher Primaten wurden die Zellen direkt in den Assay eingesetzt. Bei der Verwendung von in Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden diese nach dem Auftauen mit RPMI+++ Medium im Falconröhrchen mit leicht geöffnetem Deckel zur Gewährleistung des Gasaustausches für 2 h in einem Inkubator mit 95 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Zellzählung mit dem Coulter Counter (Beckman Coulter), pro Platte wurden jeweils 1×10^7 Zellen benötigt, dies entsprach einer Zellzahl von 4×10^6 Zellen/ml.

Nach Entfernung der Blockierungslösung (RPMI+++ Medium) wurden die Platten 6x mit PBS (200 μ L pro Loch) gewaschen und nach dem letzten Waschgang auf sterilem, saugfähigen Papier ausgeklopft. Anschließend wurden 50 μ L der in Anhang II-VI aufgeführten Peptide (10 μ g/ml, verdünnt mit Medium) in die jeweiligen Vertiefungen der 96-Loch-Platte pipettiert, jeweils in

Einzelbestimmungen als Peptid-Matrix oder in Triplikaten, wenn nur ein Peptid zur Stimulation eingesetzt wurde. In den Negativ-Kontroll-Ansätzen befanden sich 50 µL eines irrelevanten Peptids (10 µg/ml, verdünnt mit Medium) oder Medium, in der Positiv-Kontrolle befanden sich 50 µL PWM (4 µg/ml, Sigma). Nachdem 50 µL der Zellsuspension (4×10^6 Zellen/ml) in die Vertiefungen pipettiert und die Platten mit Silberfolie umwickelt wurden, erfolgte eine Inkubation im 37 °C Brutschrank mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 % für 16 h. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Platten weder bewegt noch angestoßen, da die Messergebnisse sonst nicht aussagefähig gewesen wären.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in eine Schüssel mit Teralin® geschüttet und die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Anschließend wurden die Platten 6x mit 0,05 % Tween 20 (Sigma) in PBS (200 µL pro Loch) gewaschen und nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Danach wurden sofort 100 µL eines bereits vorbereiteten Detektions-Antikörpers gegen INF γ (Mab R4-6A2 bzw. 7-B6-1-Biotin, Mabtech) in jede Vertiefung gegeben und für 2 h bei 37 °C mit einer Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert. Verdünnt wurde der Antikörper 1:1000 mit 0,5 % sterilfiltriertem FKS (Gibco BRL) in PBS. Danach wurden die Platten 6x mit PBS (200 µL pro Loch) gewaschen und nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Nach dem Waschen wurden 100 µL vorbereitete alkalische Phosphatase Streptavidin-Konjugat (Mabtech AB) in jede Vertiefung gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, verdünnt wurde das Enzym-Konjugat 1:1000 mit 0,5 % sterilfiltriertem FKS (Gibco BRL) in PBS. Danach wurden die Platten 6x mit PBS (200 µL pro Loch) gewaschen und nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Anschließend wurden 100 µL des Substrates 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl Phosphat / Nitro Blue Tetrazolium (BCIP / NBT) in jede Vertiefung gegeben (Substratzusammensetzung laut Herstellerangaben). Die Platten wurden bis zur Entwicklung von Spot Forming Units (SFU, punktförmigen Einheiten) (10 min- 2 h) mit dem Substrat inkubiert und danach 3x mit destilliertem Wasser gespült. Die Trocknung erfolgte im Dunkeln über Nacht oder 30 min vor einem Ventilator. Abschließend wurden die Platten mit Hilfe des ELISpot-Readers der Firma AID (Autoimmun Diagnostika GmbH) digital fotografiert und mit der AID elispot 3.1 Software ausgewertet.

2.8 Materialien und Geräte

2.8.1 Geräte

Gene Pulser II, Biorad

Elektro-Blotter, Biorad

Elektrophorese-kammer, Biorad

ELISpot-Reader, Autoimmun Diagnostika GmbH

Helios Gene Gun System Biorad

Horizontalschüttler, Afg

MX4000 real time PCR System, Stratagene

NanoDrop ND-1000, Peqlab

Power Supply, Biorad

Thermocycler: 200 DNA-Engine Thermocycler, MJ Research; FlexCycler, Analytik Jena

Zellzähler: Coulter Counter ZM, Beckman Coulter

2.8.2 Puffer, Medien und Lösungen

Alle Feinchemikalien wurden von Sigma bezogen.

Blockingpuffer:	5 % Milchpulver + 1 % Tween20 in PBS
DNA-Probenpuffer (2x):	950 µl Sample Buffer (Biorad) + 50 µl β-Mercapto-Ethanol
Erythrozyten-Lyse-Lösung:	8,6 g Ammoniumhydrochlorid in 1 L Wasser
Färbelösung:	Trypanblau, Sigma; Roti®-Blue, Sigma
Laufpuffer (1x):	0,025 M TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
LB-Medium(Luria-Bertani Medium):	1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Bacto Hefe Extrakt; 1 % NaCl; pH 7,0
LB _{amp} -Medium:	LB-Medium mit Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin (Amp)
LB _{amp} -Agarplatten:	LB-Medium mit 20 g/l Agar und 100 µg/ml Ampicillin

Lysispuffer:	20 mM TRIS, 150 mM NaCl, 10ml/L TritonX-100 mit HCl ad pH 7,7 + 1 Proteasetablette (Roche) pro Liter
Orange-G-Probenpuffer (6x):	650 g/L Saccharose, 4 g/L Orange-G, 10 mM EDTA in TE-Puffer
PBS:	123 mM Natriumchlorid + 2,7 mM Kaliumchlorid + 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat + 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,0, mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen
PM:	PBS mit 2% (w/v) Milchpulver (Marvel, GB)
PMT:	PM mit 0,1% (v/v) Tween 20
PT:	PBS mit 0,2% Tween 20
PVP-Stocklösung (immer frisch anzusetzen):	20 mg PVP (Biorad) in 1000 µL wasserfreiem Ethanol (100 %) gelöst, Gefäß mit Parafilm verschlossen
PVP-Arbeitslösung (c = 0,05 mg/mL):	15,5 µL PVP-Stocklösung + 6,2 mL wasserfreies Ethanol (100 %), reichte für 2 Schläuche
Spermidin-Stocklösung:	Sigma (c = 1 mol/L - bei 4 °C und dunkel zu lagern)
Spermidin-Arbeitslösung	(c = 0,05 mol/L): 25 µL Spermidin-Stocklösung + 475 µL dest. Wasser, reichte für 5 Schläuche
Substratlösung:	WesternBlot: ECLTM-WB-Detection; jeweils 1 ml Lösung A + B (reichte für eine Membran)
	ELISpot-Assay: BCIP / NBT, Biorad
	ELISA: PBS pH 6.0 mit 1 mg/ml o-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD) und 1 µl/ml H ₂ O ₂
TAE-Puffer (1x):	40 mM Tris-Acetat + 1 M EDTA, pH 8,0
TE-Puffer:	10 mM TRIS, 1 mM EDTA in dest. Wasser, pH 8,0
Waschpuffer	1x PBS mit 0,1 % Tween20

2.8.3 Herkunft der Plasmide

Die unten aufgeführten Plasmide wurden unserer Gruppe freundlicher Weise von François Villinger vom EMORY – University School of Medicine, Department of Pathology and Laboratory Medicine in Atlanta, Georgia zur Verfügung gestellt.

pGEM Rst GM-CSF cl.1 (GM-CSF aus *Macaca mulatta*)

pGEM VervGM-CSF cl.1 (GM-CSF aus *Chlorocebus aethiops*)

pGEM PTYN GM-CSF cl.1 (GM-CSF aus *Macaca nemestrina*)

Das Plasmid pCI-muGMCSF hatten wir dankenswerter Weise von Prof. Dr. J. Reimann von der Universität Ulm erhalten. Das pTH-Vektor-Konstrukt erhielten wir von Dr. T. Hanke von der Universität in Oxford.

2.8.4 Peptide

Die im Anhang II-VI aufgeführten Peptide wurden zur Stimulierung der PBMC im ELISpot-Assay eingesetzt. Jeweils 2 μ Mol eines jeden Peptids wurden von der Firma peptides&elephants synthetisiert. Durch eine Reversed-Phase-Chromatographie wurde eine Reinheit der Peptide von über 50 % bestätigt und durch eine Elektronen-Spray-Ionisation-Massen-Spektrometrie die Masse jedes einzelnen Peptids überprüft. Das Lösen der Peptide erfolgte in 100 μ L DMSO, die entstandene Lösung besitzt eine Konzentration von 10 mg/ml. Durch anschließendes Poolen der Peptide im Matrixformat ergab sich eine Vorverdünnung der einzelnen Peptide im Pool (1:10 bzw. 1:11).

Das gesamte SIVagm_{Verv}Gag-Protein umfassende Peptidset besteht jeweils aus 15meren mit einem AS-Überhang von 10 AS. Die Peptidpoolmatrix der SIVagm_{Vervet}Gag-Peptide 1-100 ist in der Tabelle im Anhang V dargestellt und umfasst die Pools 21-40. Das gesamte HIV-1 bzw. SIVmag239-Gag-Protein umfassende Peptidset besteht jeweils aus 15meren mit einem AS-Überhang von 11 AS. Die Peptidpoolmatrices dieser Peptide (HIV-1 Pool: 63-84 und SIVmac Pool:85-106) sind in den Tabellen im Anhang V dargestellt.

Das gesamte OVA-Protein umfassende Peptidset besteht jeweils aus 12-16meren mit unterschiedlichen AS-Überhängen, erstellt nach physiologischen Bedingungen durch die Internetseite <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/PEPTGEN/PeptGenSubmitForm.html>. Die Sequenz des Proteins wurde in drei gleichgroße Teile geteilt und die darin enthaltenen Peptide jeweils gepoolt, so dass drei OVA-Peptidpools entstanden. Diese wurden dann im ELISpot-Assay zur Detektion von spezifischen Primaten-PBMC genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der Gene SIVagmGag und SIVmacGag

3.1.1 Codonoptimierung der Gene SIVagmGag und SIVmacGag

Für die Generierung der codonoptimierten Sequenzen wurde der optimale Codon-Gebrauch von Säugetieren [148] (Tabelle 22) verwendet. Die SIVagmGag und SIVmacGag Wildtyp-Sequenzen sind im Vergleich zur jeweils theoretisch ermittelten codon-optimierten und zur sich tatsächlich in dem Immunisierungsvektor pTH befindlichen Sequenz im Anhang VII-VIII dargestellt. Die codonoptimierten Sequenzen von SIVagmGag entsprechen der WT-Sequenz nur noch zu 73 % bei gleichbleibender Aminosäuresequenz. In der theoretisch codonoptimierten Sequenz sind 360 Codons geändert, in der tatsächlich generierten codonoptimierten Sequenz sind es 357. Dies entspricht 68,3-68,9 % geänderte Codons. Im Fall von SIVmacGag stimmen die CO-Sequenzen nur noch zu 74 % mit der WT-Sequenz überein, hier sind es 330 bzw. 328 geänderte Codons. Dies entspricht prozentual 64,2-64,6 % geänderten Codons, geringfügig weniger als bei der Sequenz von SIVagmGag. Variationen von der theoretischen zur tatsächlich codonoptimierten Sequenz ergaben sich aufgrund von falsch synthetisierten Ausgangsoligonukleotiden oder Fehlern bei der Elongation der Taq-Polymerase, da diese keine Fehlerkorrekturfunktion besitzt. Da Mutagenese-PCRs langwierig und manchmal auch nicht durchführbar sind, wurden nur solche Varianzen entfernt, die zu einem Frameshift oder einer Aminosäuresubstitution geführt hätten.

Tabelle 22: Verwendete optimale Codons für Säugetiere [148]

Aminosäure		DNA-Sequenz	Aminosäure		DNA-Sequenz
Ein-Buch- stabencode	Drei-Buch- stabencode	bei codon-optimierten Sequenzen	Ein-Buch- stabencode	Drei-Buch- stabencode	bei codon-optimierten Sequenzen
A	Ala	GCC	I	Ile	ATC
R	Arg	CGC	L	Leu	CTG
H	Asn	AAC	K	Lys	AAG
D	Asp	GAC	F	Phe	TTT
C	Cys	TGC	P	Pro	CCC
Q	Gln	CAG	S	Ser	AGC
E	Glu	GAG	T	The	ACC
G	Gly	GGC	Y	Tyr	TAC
H	His	CAC	V	Val	GTG

3.1.2 Vergleich der Expressionsstärke von CO- und WT-Sequenz *in vitro*

Durch die Codonoptimierung entstand eine wesentlich größere Menge an Protein bei gleicher Menge an transfizierter DNA, gleicher Anzahl zu transfizierenden CHO-Zellen und gleichem Volumen an aufgetragenem Zelllysate im Westernblot (Abb. 14).

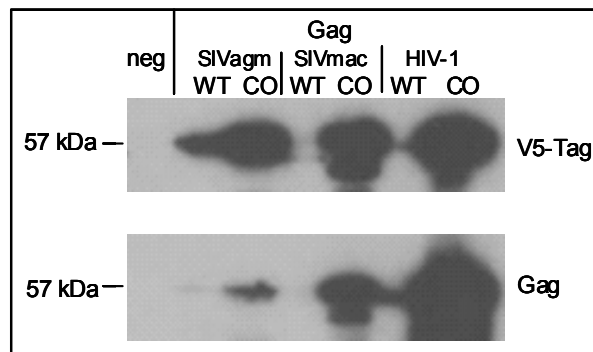


Abb. 14: Westernblot Analyse der Transfektion von CHO-Zellen mit SIVagmGagWT/CO, SIVmac-GagWT/CO und HIV-1Gag-WT/CO (oben α V5-AK, unten AG3.0-AK spezifisch für Gag)

Durch die codonoptimierten Gene wurde 2-10x mehr Protein gebildet als durch die Wildtypgene, wie durch Quantifizierung mittels p24/p27-Sandwich-ELISA hervorging (Daten nicht gezeigt).

3.2 DNA-Immunisierung im Maus-Modell

3.2.1 Vergleich der Immunogenität von CO- und WT-Sequenz *in vivo*

Die Immunogenität der Gene im Immunisierungsvektor pTH wurde durch Immunisierung von Mäusen überprüft. Dabei wurden Balb/c- und C57Bl/6-Mäuse (Haplotyp H-2^d und H-2^b) mittels Gene Gun im Prime/45 Tage Boost-Rhythmus immunisiert. Wie in der Abb. 15 exemplarisch zu sehen ist, ließ sich im Gegensatz zur SIVagmGagWT-Gen-Immunisierung in Balb/c Mäusen eine größere Anzahl an spezifischen Mausmilzzellen mit der CO-Variante induzieren. Das gleiche Bild ergab sich für die Induktion der zellulären Immunantwort in C57Bl/6 Mäusen (Daten nicht gezeigt).

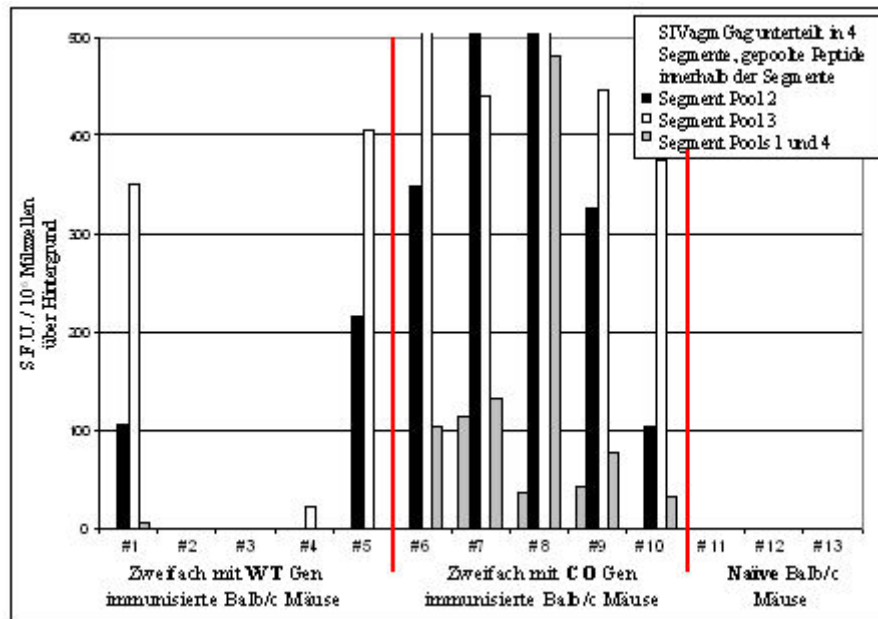


Abb. 15: Vergleich von induzierter zellulärer Immunantwort durch Immunisierung mit dem SIVagmgagCO (#1-5) bzw. -WT-Gen (#6-10) in Balb/c Mäusen

Die Möglichkeit durch die bioballistische DNA-Immunisierung Antikörper zu induzieren, gelang unter diesen Versuchsbedingungen nur durch die Verwendung von codonoptimierten Genen. Der SIVagmGag-Antikörpertiter war in beiden Mausstämmen ähnlich, wenn auch der Titer hier in der Abbildung in den C57Bl/6 Mäusen einen geringfügig höheren Wert aufzeigt (Abb. 16). Bei anderen Studien wiesen die Seren der Balb/c Mäuse einen höheren SIVagmGag-Antikörpertiter auf. Die Immunisierungen mit den anderen *gag*-Genen (SIVmac und HIV-1) führte ebenso zu einem höheren Antikörpertiter in Balb/c Mäusen als in C57Bl/6 Mäusen (Daten nicht gezeigt).

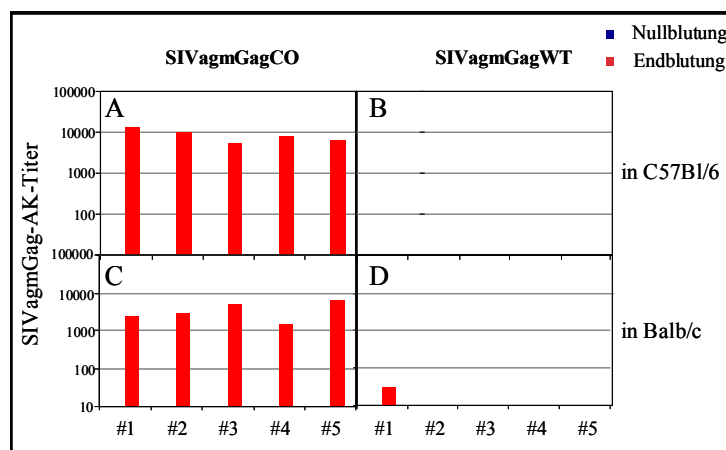


Abb. 16: Induktion eines Anti-SIVagmGag-Antikörpertiter

- A durch Immunisierung mit dem SIVagmgagCO-Gen in Balb/c Mäusen
- B durch Immunisierung mit dem SIVagmgagWT-Gen in Balb/c Mäusen
- C durch Immunisierung mit dem SIVagmgagCO-Gen in C57Bl/6 Mäusen
- D durch Immunisierung mit dem SIVagmgagWT-Gen in C57Bl/6 Mäusen

Die Induktion der zellulären und humoralen Immunantwort durch Verwendung der Gene SIVmacgagCO/WT und HIV-1gagCO/WT ergab die gleiche Differenz zwischen den codonoptimierten und Wildtyp-Varianten (Daten nicht gezeigt).

Die signifikanten Unterschiede zwischen der Immunisierung mit dem codonoptimierten Gen zur Wildtyp-Variante wurden auch bei unterschiedlichen Mengen an applizierter DNA deutlich (Abb. 17 und 18). Es wurden jeweils die Tiere einer Gruppe entweder mit 0,014 μ g, 0,14 μ g oder 1,4 μ g gag DNA einmal immunisiert, die Menge an muGMCSF blieb dabei allerdings gleich (1,4 μ g pro Immunisierung). Dasselbe Versuchsschema wurde jeweils für die CO- und WT-Variante durchgeführt. Die Abb. 17 zeigt, dass durch die Veränderung des Gens im Durchschnitt nur ein Zehntel der Menge des WT-Gens nötig war, um die gleiche Anzahl an spezifischen T-Zellen zu induzieren.

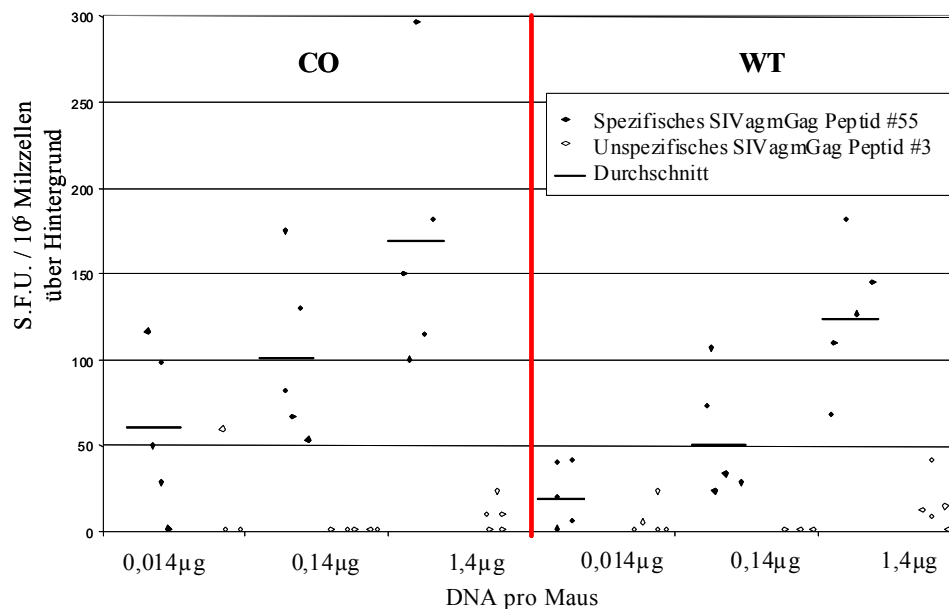


Abb. 17: Vergleich verschiedener verabreichter DNA-Mengen innerhalb desselben Gens bzw. zwischen der CO- und WT-Variante von SIVagmgag; zelluläre Immunantwort in Balb/c Mäusen

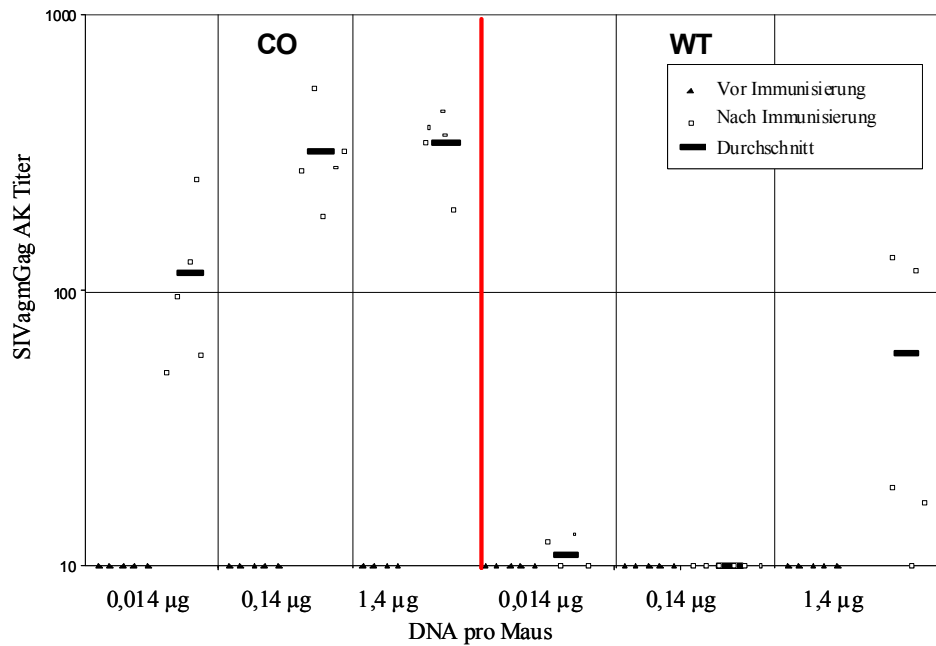


Abb. 18: Vergleich verschiedener verabreichter DNA-Mengen innerhalb desselben Gens bzw. zwischen der CO- und WT-Variante von SIVagmgag; humorale Immunantwort in Balb/c Mäusen

Die Induktion von Gag-spezifischen Antikörpern gelang unter diesen Versuchsbedingungen ebenso gut wie die Induktion der spezifischen CTLs hauptsächlich durch die Codonoptimierung der DNA-Sequenz (Abb. 18). Durch die Verwendung von einem 100stel der DNA-Menge des Wildtypgens (1,4 µg WT-DNA / Immunisierung und Maus) an codonoptimierter DNA (0,014 µg CO-DNA / Immunisierung und Maus) wurde in etwa der gleiche Antikörpertiter erreicht.

Durch die Verwendung von codonoptimierten Genen war es teilweise überhaupt erst möglich, eine Immunantwort zu induzieren. Die Codonoptimierung der DNA nimmt für die Induktion einer Immunreaktion einen wesentlich größeren Stellenwert ein als die Quantität der DNA, da bei ersterer durch kleinere Sequenzvariationen im Gegensatz zu Mengenfehlern größere Varianzen auftreten würden.

3.2.2 Notwendigkeit für die Koapplikation von murinem GMCSF

Die erste Mausstudie erfolgte ohne die Koapplikation von murinem GMCSF. Es konnten keine spezifischen Milzzellen und nur geringe Mengen an α Gag-Antikörpern identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Die folgenden Studien wurden mit Koapplikation von murinem GMCSF als Immunstimulator durchgeführt. Es ließen sich durch den Prime/45 Tage Boost-Rhythmus spezifische Milzzellen und α GagAntikörper nachweisen (Abb. 17 und 18).

3.2.3 Epitopkartierung von SIVagmGag und SIVmacGag in Balb/c- und C57Bl/6-Mäusen

Durch bioballistische DNA-Immunisierungen wurden Balb/c- (Haplotyp H-2^d) und C57Bl/6-Mäuse (Haplotyp H-2^b) immunisiert, um anschließend die Milzzellen zu entnehmen und mittels überlappender 15mer Peptide CTL-Epitope zu kartieren. Durch die Benutzung von Peptiden, die das ganze Protein abdecken, konnten CTL-Epitope von SIVagmGag und SIVmacGag in Mäusen mit dem Haplotyp H-2^b bzw. H-2^d identifiziert werden.

Die Identifizierung eines 15mer Peptids als signifikant INF γ induzierendes Agens bei der Stimulation von Mausmilzzellen geht auf zwei positive Reaktionen im ELISpot-Assay zurück, da jedes Einzelpeptid in zwei unterschiedlichen Peptidpools enthalten ist. Konnte nur ein Peptidpool eine signifikant hohe Menge an Milzzellen stimulieren, wurde diese als falsch positive Reaktion gewertet, da die theoretisch durch den zweiten Peptidpool hervorgerufene Reaktion fehlte. In der nachfolgenden Tabelle ist exemplarisch der Aufbau einer solchen Peptid-Matrix zu sehen.

Tabelle 23: Matrix für die Pools der einzelnen SIVagm_{Ver}Gag-Peptide, farblich unterlegt sind die jeweilig kartierten 15mere in den verschiedenen Mausstämmen

SIVagm _{Ver} Gag Peptidpools	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
21	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
22	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
23	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
24	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
25	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
26	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
27	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
28	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
29	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
30	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

Balb/c

C57Bl/6

In der Abbildung 19 sind spezifische T-Zell-Reaktionen der Milzzellen von mit SIVagmGag-DNA immunisierten C57Bl/6 Mäusen zu sehen. Das identifizierte 15mer Epitop besaß die Aminosäuresequenz DRFYKAIRAEQASGE. Die Stimulation der Milzzellen durch Nonamere erzielte kein eindeutiges CTL-Epitop mit neun Aminosäuren Länge. Auf die gleiche Weise konnte aber ein CTL-Epitop in Balb/c Mäusen detektiert werden, dieses hat die Aminosäuresequenz VGAIYRRWIILGLQK. Mit Hilfe der Feinkartierung konnten zwei Nonamere mit den Sequenzen AIYRRWIIL und YRRWIILGL identifiziert werden, diese sind zwar zueinander in der Anzahl der spezifischen T-Zellen äquivalent, jedoch induzieren sie bei wesentlich weniger Milzzellen eine INF γ -Produktion als das 15mer Peptid (Daten nicht gezeigt).

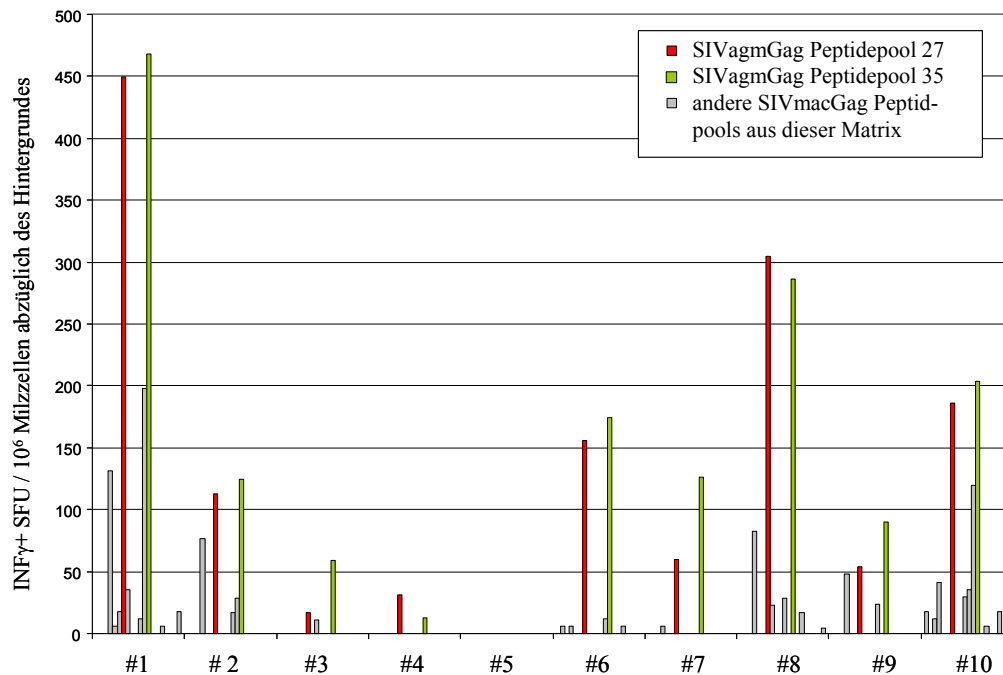


Abb. 19: ELISpot-Assay – Kartierung des SIVagmGag Epitops in C57Bl/6 Mäusen #1-#10 zweifach mit SIVagmGag-DNA immunisierte C57Bl/6 Mäuse

Durch die Benutzung der 15mer Peptide im Matrixformat reagierten die C57Bl/6 Milzzellen auf die SIVmacGag-Peptidpools 92, 96 und 97 (siehe auch Anhang V), was auf die sich überlappenden 15mer SIVmacGag-Peptide Nr. 78 und 79 (QTDAAVKNWMTQTLL und AVKNWMTQTLLIQNA) hindeutete. Der überlappende Bereich AVKNWMTQTLL bestand aus elf Aminosäuren und konnte durch Feinkartierung als der signifikante Bereich charakterisiert werden (Daten nicht gezeigt). Die in dem 11mer liegenden Nonamere regten nur 95 bzw. 145 spezifische T-Zellen von einer Million Milzzellen an, dies entsprach $< 0,01\%$ der Milzzellen. Wohingegen das 11mer SIVmacGag-Peptid 0,04-0,05 % der Milzzellen stimulierte und somit ein CTL-Epitop für den Haplotyp H-2^b der C57Bl/6-Mäuse ist. Das SIVmacGag-Epitop in Balb/c konnte, wie auch in der Arbeitsgruppe um J. zur Megede (submitted), nicht detektiert werden.

Die HIV-1-Gag-Peptidpools 67, 78 und 79 stimulierten eine signifikante Anzahl an Splenozyten der zuvor mit HIV-1Gag-DNA immunisierten Mäuse. Das 15mer Peptid 49 bzw. 50 (GHQAAMQMLKDTINE bzw. AMQMLKDTINEEAAE) war in den oben genannten Peptidpools enthalten. Durch Überlappung der beiden Peptide und durch Angaben in der Literatur sprach alles für das Nonamer AMQMLKDTI. In der Literatur wurde ein Nonamer der HIV-1_{HXB2}-Sequenz für den Maus-MHC-Typ H-2^d beschrieben, welcher an der Position 7 eine Glutaminsäure statt einer Asparaginsäure trägt. Durch Stimulation der Milzzellen mit dem Nonamer der tatsächlichen Aminosäuresequenz konnte bestätigt werden, dass es diese Methode ermöglicht, Epitope durch überlappende 15mer Peptide zu kartieren (Abb. 20).

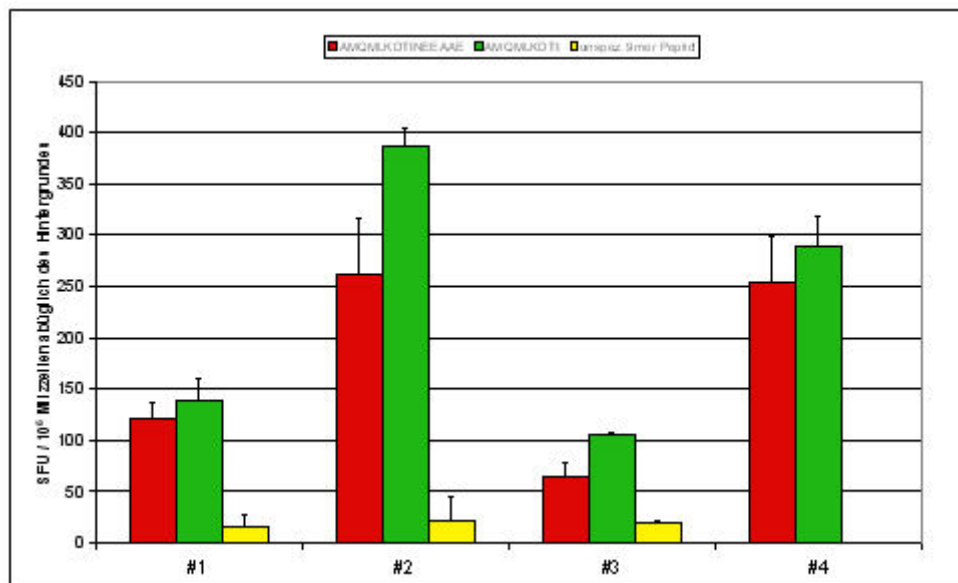


Abb. 20: ELISpot-Assay – Feinkartierung des HIV-1Gag Epitops in Balb/c Mäusen #1-#4 zweifach mit HIV-1gagCO-DNA immunisierte Balb/c Mäuse
Rot- 15mer **Grün** - 9mer **Gelb-** unspez. 9mer

Die kartierten MHC-I-Epitope von SIVagmGag, SIVmacGag und HIV-1Gag in den verschiedenen Mausstämmen ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 24: Kartierte Gag-Peptide in Balb/c und C57Bl/6 Mäusen, Position im Gen siehe auch Anhang VII, VIII und X

Ag	Balb/c = H-2 ^d	Position [AS]	C57Bl/6 = H-2 ^b	Position [AS]
SIVagmGag	AIYRRWIIL / YRRWIILGL	Gag ₂₇₃₋₂₈₁ / Gag ₂₇₅₋₂₈₃	DRFYKAIRAEQASGE	Gag ₃₁₁₋₃₂₅
SIVmacGag	—	—	AVKNWMTQTL	Gag ₃₁₃₋₃₂₂
HIV-1 Gag	AMQMLKDTI	Gag ₁₉₇₋₂₀₅	—	—

Die Epitope des SIVagmGag für beide Mausstämmen lassen sich in geringer Abwandlung in den von Mata et al. [157] beschriebenen CD4⁺-T-Zell-Epitopen wiederfinden. Das Peptid MRC-13 besitzt die Aminosäuresequenz NPPIPVGGEIYKRWIILGLNK, befindet sich an Position Gag₂₅₃₋₂₇₂ des HIV-1_{SF2}-Isolats und weist starke Homologie zu den kartierten Epitopen für Balb/c Mäuse auf. Ebenso zeigt auch das CD4⁺-Helfer-T-Zell-Epitop MRC-17 (Gag₂₉₃₋₃₁₂, FRDYVDRFYKTLRAEQASQD) große Ähnlichkeit zum kartierten Epitop für C57Bl/6 Mäuse. Die Präsenz von CD4⁺-Helfer-T-Zellen in der PBMC-Population führt zur Detektion einer höheren Anzahl an INF γ produzierenden Zellen nach Peptidexposition. Dies würde erklären, weshalb im Fall der Epitope für die Balb/c Mäuse durch das 15mer eine höhere Anzahl an PBMC stimulierbar war. Ebenso würde es erklären, weshalb durch das 15mer C57Bl/6 Milzzellen stimulierbar waren, hingegen aber kein CTL-Epitop identifiziert werden konnte.

3.2.4 Feinkartierung von CTL-Epitopen

Die vorhergesagten optimalen Peptide, welche an die MHC-I-Moleküle der CD8⁺-Zellen und die TCR der spezifischen T-Zellen binden, sind meistens neun Aminosäuren lang. Dennoch gibt es auch längere oder kürze Peptide, die an mehr spezifische Zellen binden als es Nonamere zu tun vermögen.

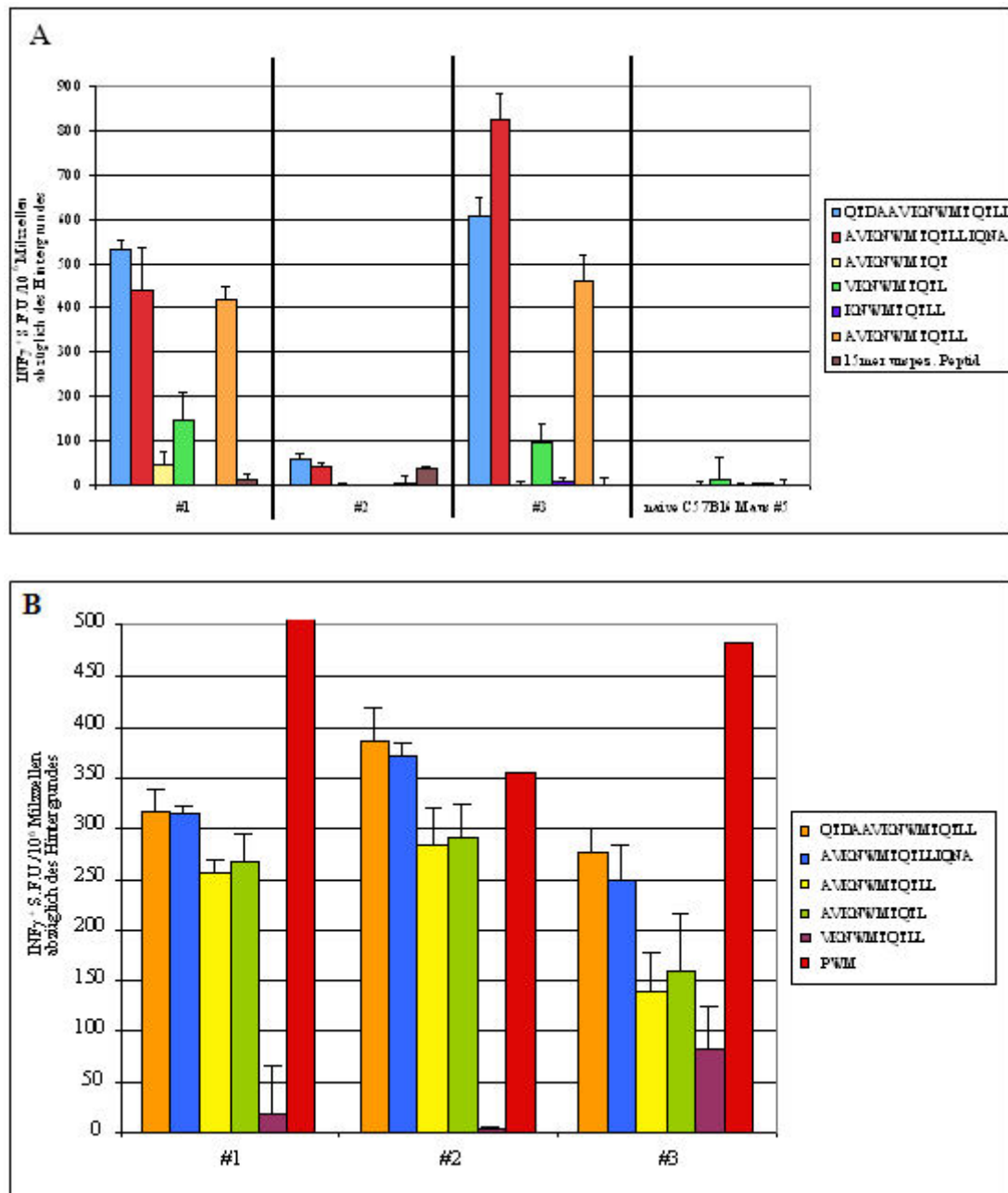


Abb. 21: ELISpot-Assay - Feinkartierung des SIVmacGag Epitops in C57Bl/6 Mäusen

A Unterteilung des überlappenden Teils der 15mere in Nonamere

#1-#3 zweifach mit SIVmacGagCO-DNA immunisierte Mäuse + naive C57Bl/6 Maus

B Unterteilung des überlappenden Teils der 15mere in Dekamere

#1-#3 zweifach mit SIVmacGagCO-DNA immunisierte Mäuse

PWM = Pokeweed Mitogen; positiv Kontrolle

In der Abbildung 21A ist zu sehen, dass das 11mer wesentlich mehr spezifische Zellen stimuliert als die verschiedenen Nonamere, die jeweils zueinander immer um eine Aminosäure Richtung N-Terminus verschoben sind. Die durch das 11mer hervorgerufene Anzahl spezifischer Zellen entspricht fast der durch die 15mere SIVmacGag78₃₀₉₋₃₂₃ und SIVmacGag79₃₁₃₋₃₂₇ induzierten Anzahl. Um dieses 11mer weiter zu charakterisieren, wurde ein ELISpot-Assay durchgeführt, in dem das überlappende 11mer in zwei Dekamere unterteilt und getestet wurde. Das Dekamer AVKNWMTQTL konnte als das optimale Epitop identifiziert werden (Abb. 21B). Dennoch erreichte es nicht die Stärke der Immunantwort, die die 15mer langen Peptide induzierten. Dies könnte darauf hindeuten, dass durch die 15mere noch CD4⁺-Helfer-Zellen angesprochen wurden. Allerdings ist in der HIV-Datenbank Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index>) kein CD4⁺-T-Helferzellen-Epitop mit einer ähnlichen Sequenz hinterlegt oder ein CD4-Bindemotiv innerhalb der Sequenz QTDAAVKNWMTQTLLIQNA (SIVmacGag₃₀₉₋₃₂₇) von Syfpeithi (<http://www.syfpeithi.de>) vorhergesagt.

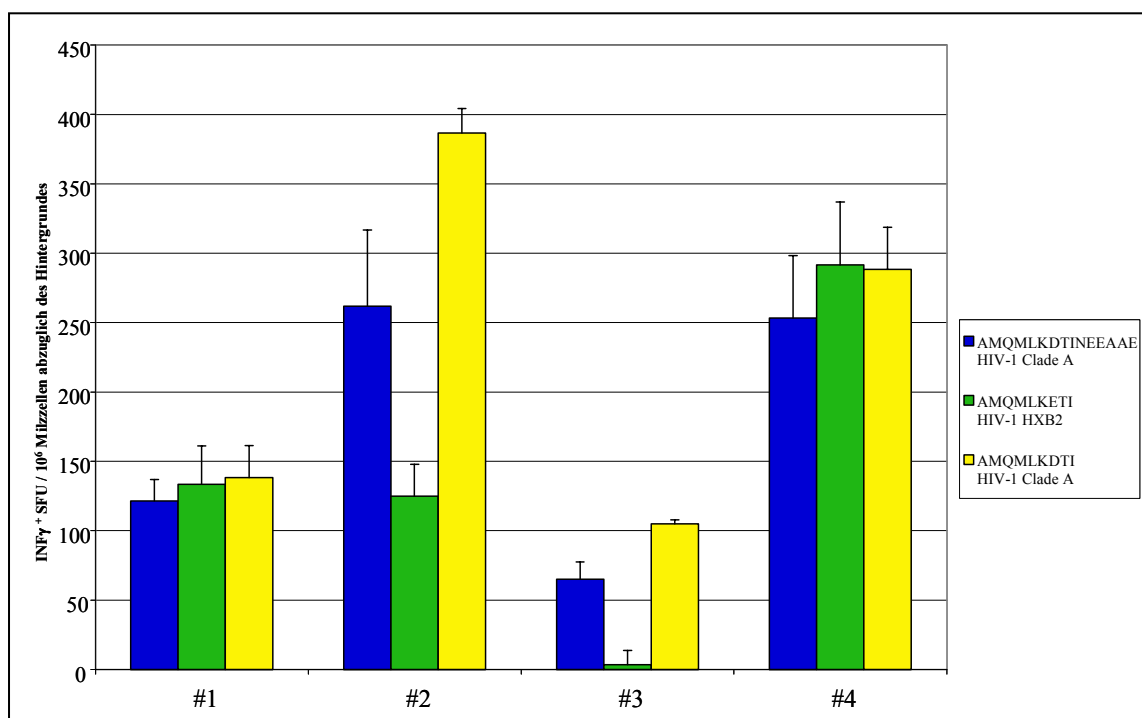


Abb. 22: ELISpot-Assay - Feinkartierung des HIV-1Gag Epitops in Balb/c Mäusen
#1-#4 zweifach mit HIV-1gagCO-DNA immunisierte Balb/c Mäuse

Eine weitere Charakterisierung des CTL-Epitops wurde mit Milzzellen von mit HIV-1Gag-DNA immunisierten Balb/c Mäusen durchgeführt. Das aus den HIV-1_{CladeA}Gag Peptidpools kartierte 15mer AMQMLKDTINEEAAE hat ebenso gut wie das Nonamer AMQMLKDTI der gleichen Sequenz gebunden (Abb. 22). In 50 % der getesteten Mäuse (#2 und #3) ging das in der Literatur beschriebene Peptid AMQMLKETI der HIV-1_{Clade B}HXB2-Sequenz (grün) schlechter eine Ver-

bindung zum MHC-I-Molekül ein als das in der Abbildung gelb dargestellte Nonamer. Die Position 7 ist laut der SYFPEITHI-Datenbank (<http://www.syfpeithi.de/home.htm>) zur Vorhersage von Bindungsmotiven keine Ankersequenz, sondern nur die Positionen 2 und 9. Daraus kann man schließen, dass eine Veränderung der Aminosäure an Position 7 auf die Erkennung vom MHC-I-Peptid-Komplex durch den T-Zellrezeptor inhibierend wirkt.

3.3 DNA-Immunisierung im Primaten-Modell

3.3.1 Konstruktion der Immunmodulatoren *gmcsf* für den Primatenterversuch

Die Identifizierung der DNA-Sequenz für das *gmcsf* Gen von AGM konnte durch Anwendung einer RT-PCR mit abgeleiteten spezifischen Primern aus stimulierten AGM-PBMC erzielt werden. Die Ergebnisse der Sequenzierung dieser DNA ist folgend dargestellt:

```

1  atgtggctgc agggcctgct gctcttgggc actgtggcct gcagcatctc tgcacccgcc
   m w l  q g l  l l l g  t v a  c s i  s a p a

61  cgctcgccca gcccggcac acagccctgg gagcatgtga atgccatcca ggaggcccg
   r s p  s p g  t q p w  e h v  n a i  q e a r

121  cgtctcctga acctgagtag agacactgct gctgagatga ataaaaccgt agaagtcgtc
   r l l  n l s  r d t a  a e m  n k t  v e v v

181  tcagaaatgt ttgacctcca ggagccgagc tgcctacaga cccgcctgga gctgtacaag
   s e m  f d l  q e p s  c l q  t r l  e l y k

241  cagggcctgc agggcagcct caccaagctc aagggccctt tgaccatgat ggccagccac
   q g l  q g s  l t k l  k g p  l t m  m a s h

301  tacaagcagc actgccctcc aaccccgga aacttcctgtg caaccagat gatcaccttc
   y k q  h c p  p t p e  t s c  a t q  m i t f

361  caaagtttca aagaaaacct gaaggacttt ctgcttgatc tccccttga ctgctgggag
   q s f  k e n  l k d f  l l v  i p f  d c w e

421  ccagtccagg agtga
   p v q  e -

```

Abb. 23: Sequenzierungsergebnisse der *gmcsf* Sequenz von AGM (schwarz DNA-Sequenz, grün Translation im Einbuchstaben-Code)

Der Eintrag in der PubMed-Datenbank ist unter der Zugangsnummer GenBank DQ845250 zu finden. Im Vergleich zu den *gmcsf* Genen von Mensch (huGMCSF, *Homo sapiens sapiens*), Rhesusaffe (rhGMCSF, *Macaca mulatta*) und Schweinsaffe (nemGMCSFptyn, *Macaca nemestrina*) ergab sich folgende Abbildung:

huGMCSF	1	mwlsllllgtvacsisaparspsstqpwehvnaigearrllnlsrda
rhGMCSF	1	...g.....g.....
nemGMCSFptyn	1	...g.....g.....t
agmGMCSF	1	...g.....g.....
huGMCSF	51	aennetvevisemfdlqepclqtrlelykqglrgsltklkgpltmash
rhGMCSF	51	...k...v.....s.....q.....
nemGMCSFptyn	51	...k...v.....s.....q.....
agmGMCSF	51	...k...v.....s.....q.....
huGMCSF	101	ykqhc ptpetscatqiitfesfkenlkdfllvipfdcwepvqe-
rhGMCSF	101q.....
nemGMCSFptyn	101q.....
agmGMCSF	101m...q.....

Abb. 24: Sequenzvergleich von GMCSF verschiedener Altweltaffen auf Aminosäureebene, rot eingrahmt sind die jeweiligen Unterschiede zur humanen Sequenz

Bei allen nicht-humanen Primaten gibt es sieben Unterschiede zur humanen Sequenz. Zusätzlich weist die Sequenz des Schweinsaffen an Aminosäureposition 50 ein Threonin anstatt eines Alanins auf, was sie auch vom *gmcsf* vom Rhesusaffen und AGM unterscheidet. An Aminosäureposition 117 der agmGMCSF-Sequenz tritt an die Stelle des Isoleucins ein Methionin. Aufgrund des nicht einschätzbaren Einflusses dieser Sequenzvarianzen auf die immunmodulatorische Wirkung des GMCSF wurden die Gene speziesspezifisch verwendet.

Die *gmcsf* Gene der Spezies AGM, AGM Unterart Vervet, Rhesusaffen und Schweinsaffen wurden anschließend auf ihre Expressionsstärke *in vitro* getestet. Dabei wurden HEK293T-Zellen mit allen Konstrukten im pTH-Vektor transfiziert und die Proteinexpression im Westernblot analysiert.

Die Abbildung 25 weist bei allen Konstrukten eine starke Bande bei 15 kDa und zwei schwächere Banden bei 20 und 25 kDa auf. Die 15kDa-Bande ist das reife GMCSF-Protein, die anderen zwei Banden stellen Vorläuferproteine dar. Da die gleichen Mengen an DNA in die gleiche Anzahl an Zellen transfiziert und die gleiche Menge an Zelllysate im Westernblot aufgetragen wurden, scheinen die Genprodukte von AGM und Rhesusaffen gleich hoch und am stärksten exprimiert worden zu sein. Das GMCSF des Schweinsaffen wurde am schwächsten exprimiert. Der einzig bekannte Unterschied zwischen dem pTH-agmGMCSF- und dem pTH-agm_{verv}GMCSF-Konstrukt liegt in der Herkunft. Das pTH-agmGMCSF-Konstrukt entstammte den PBMC eines AGM ohne dessen

Unterart zu kennen. Das pTH-agmVervGMCSF-Konstrukt entstammte dem von François Villinger von EMORY gesandtem pGEM-VervGM-CSF cl.1 (Abschnitt 2.8.7), das nachweislich auf einen AGM der Unterart Vervet zurückging. Für die Immunisierung der AGM wurde pTH-agmGMCSF verwendet und für die Rhesusaffen pTH-rhGMCSF.

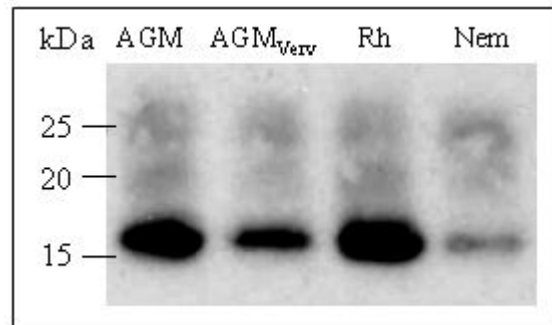


Abb. 25: Westernblot, GMCSF-Expression der Spezies AGM, AGM Unterart Vervet, Rhesusaffen und Schweinsaffen (α V5-AK)

3.3.2 Applikation der Immunisierungs-DNA bei den Primaten

Die Primaten wurden vier Mal mit SIVagmGag- bzw. SIVmacGag-DNA in Kombination mit speziesspezifischer *gmcsf* DNA im Abstand von jeweils drei Wochen per Gene Gun immunisiert und anschließend drei weitere Wochen später mit SIVagm bzw. SIVmac239 infiziert.

Die Applikationsstelle auf dem Bauch der Primaten färbte sich nach dem Schuss bei beiden Primatenspezies rot und ähnelte einem Bluterguss (Abb. 26A, B, E und F). Allerdings trat dies bei den verschiedenen Affen unabhängig von der Spezies unterschiedlich stark auf. Die Hautpartie verschorfte im Laufe der folgenden Tage anscheinend ohne Juckreiz oder Schmerzen bei den Tieren auszulösen (persönliche Mitteilung Dr. Cheick Coulibaly, Abb. 26I). Bei der nächsten Immunisierung waren die Hautpartien wieder normal (Abb. 26J). Zusätzliche Applikationen von Immunisierungs-DNA ohne Adjuvanz *gmcsf* und von nackten Goldpartikeln auf die Haut ergaben, dass weder die Immunisierungs-DNA noch die Adjuvanz-DNA für die Rötung verantwortlich waren, denn diese Hautstellen glichen in ihrer Reaktion (Abb. 26C und D). Auch wenn die Abbildung 26C und D eine schwächere Rötung zeigen, entwickelten sich die zusätzlich beschossenen Hautpartien ebenso wie die anderen Applikationen mit leichter Schwellung, Bluterguss und Verschorfung. Die aufgetretenen Hautreaktionen waren keine Immunreaktion, sondern physikalischer Natur und auf die wahrscheinlich sehr dünne Haut der Primaten in Kombination mit dem Druck von 200 psi zurückzuführen. Die Hautirritationen sind weder bei vorhergehenden Versuchen an Primaten [158, 159, 160, 161, 162, 163] noch bei anderen Tierspezies (Maus Abb. 26G und H,

Ratte oder Huhn) bislang beobachtet oder beschrieben worden, weshalb solch eine Reaktion bei den Primaten nicht erwartet wurde.

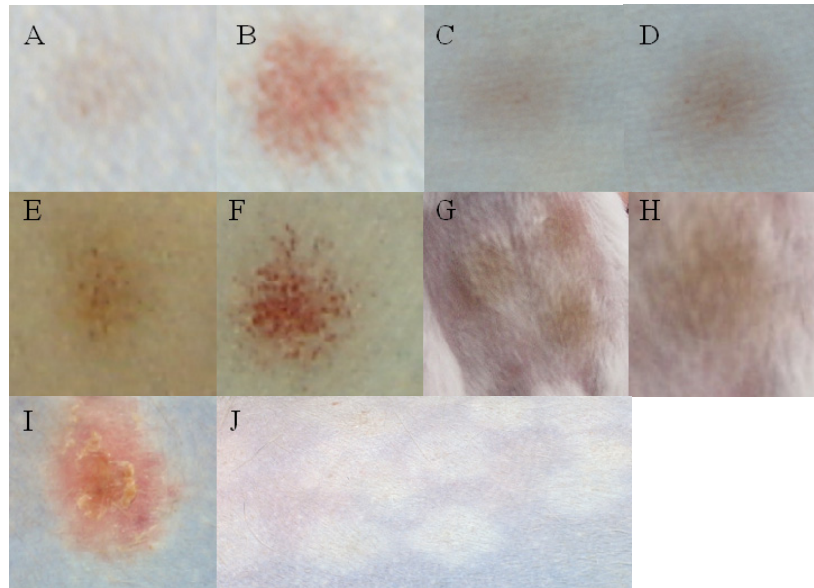


Abb. 26: Hautreaktionen nach Applikation der Goldpartikel

- A/B:** milde (A) bzw. starke (B) Reaktion bei den AGM
C: durch Goldpartikel ohne Immunisierungs-DNA bei einem AGM
D: durch Goldpartikel ohne DNA bei einem AGM
E/F: milde (E) bzw. starke (F) Hautreaktion bei den Rhesusmakaken
G/H: Hautreaktionen bei Balb/c Mäusen
I: AGM 4 Tage nach DNA-Applikation
J: AGM 3 Wochen nach 1. Immunisierung

3.3.3 Antikörpertiter im Verlauf der Studie

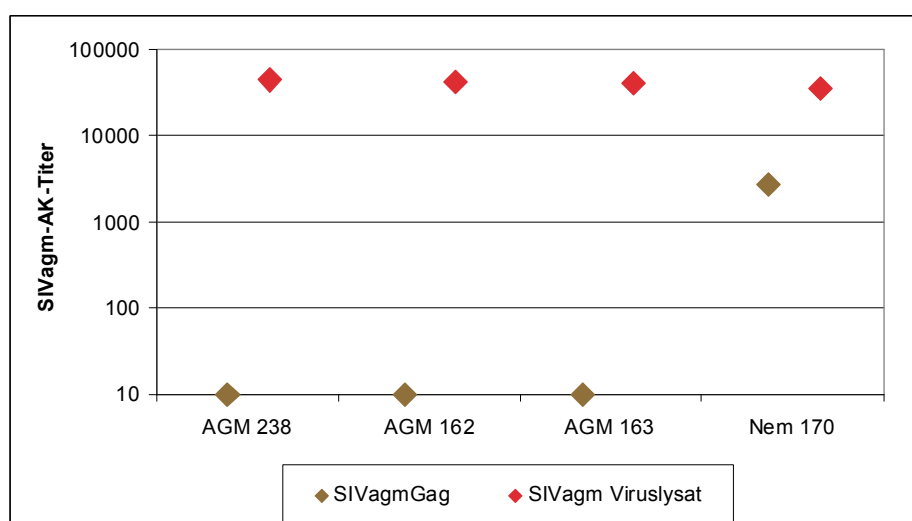


Abb. 27: Antikörpertiter gegen SIVagmGag langfristig SIVagm infizierter(m) AGM bzw. Schweinsaffen (*M. nemestrina*)

Im Verlauf einer natürlichen oder experimentellen Infektion von AGM mit SIVagm kommt es in den AGM zu einem Anstieg des Antikörpertiters, in welchen die Antikörper vermutlich hauptsächlich gegen das Hüllprotein Env gerichtet sind. Allerdings fehlen diesen Meerkatzen Antikörper gegen das Kernprotein Gag auch nach Langzeitinfektion von mehr als 5 Jahren (Abb. 27). Wie schon in vielen Studien veröffentlicht, bilden die Rhesusmakaken Antikörper, die gegen die beiden verschiedenen Virusproteine gerichtet sind [164].

3.3.3.1 Gesamt-AK-Immunantwort bis zur 4. Wochen nach Infektion

Der in Abbildung 28 dargestellte Antikörpertiter bezieht sich vor Infektion nur auf die antiGag-AK, die durch Immunisierung mit codonoptimierter *gag* DNA induziert wurden. Nach Infektion beschreiben diese Antikörpertiter die Gesamt-AK-Immunantwort gegen alle Komponenten des Virus, da hier Viruslysate im ELISA als Antigen eingesetzt wurde. Aufgrund des ersten Kontakts des Immunsystems mit der Hülle des Virus sind die vermutlich hauptsächlich gebildeten Antikörper gegen das Hüllprotein Env gerichtet.

Die in den Gruppen 2-6 auftretende anamnesticke humorale Immunantwort (Abb. 28B-D) fehlt in der Gruppe 1 (Abb. 28A, AGM immunisiert mit SIVagmGagCO und belastet mit SIVagm) gänzlich. Die anamnesticke Immunantwort beschreibt das kurz nach Infektion auftretende starke Ansteigen der Immunreaktion, hier der humoralen Immunantwort, gegen ein Infektionsagens und spiegelt das Vermögen der Immunisierung wider, Gedächtnis B-Zellen zu erzeugen. Demnach ist es durch die Immunisierung mit SIVagmGagCO in den AGM nicht gelungen, eine Gedächtnis-Immunreaktion auf humoraler Ebene zu induzieren, wohl aber durch SIVmacGagCO in den AGM und durch SIVagmGagCO in den Rhesusmakaken. Das heißt, die AGM sind dazu befähigt, eine anamnesticke Immunantwort auszubilden und die durch die Immunisierungs-DNA SIVagmGagCO gebildeten Proteine sind in der Lage, eine anamnesticke Immunreaktion nach Infektion zu induzieren. Jedoch in Kombination von AGM und SIVagmGagCO als Immunisierungsagens bleibt eine anamnesticke humorale Immunantwort aus.

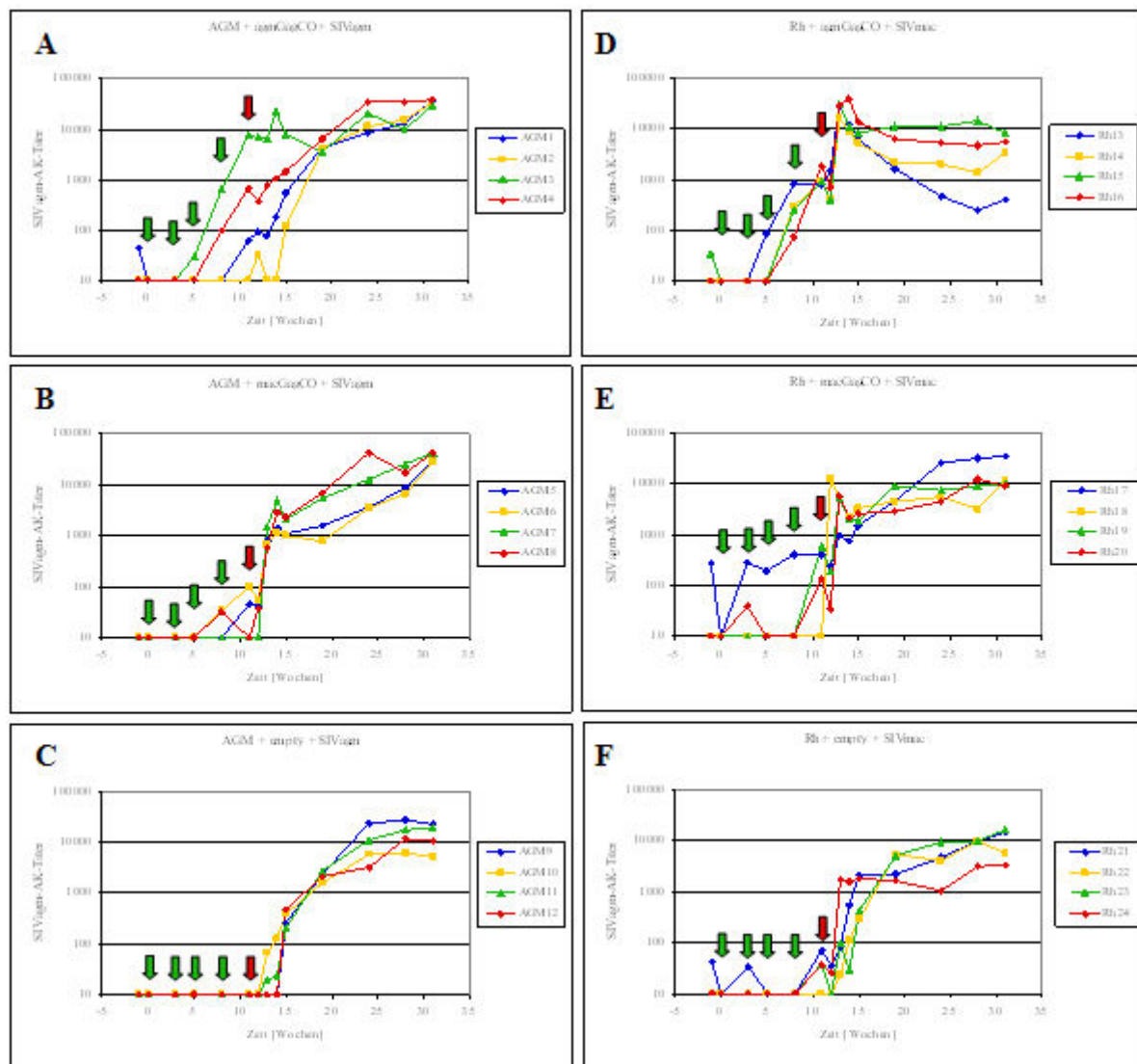


Abb. 28: Darstellung des Gesamt-AK-Titers im zeitlichen Verlauf [in Wochen] aller Primaten dieser Studie bis 20 Wochen nach Infektion; **Grüner Pfeil** Immunisierung **Roter Pfeil** Infektion,

- A** AGM immunisiert mit SIV_{agn}GagCO und infiziert mit SIV_{agn}
B AGM immunisiert mit SIV_{mac}GagCO und infiziert mit SIV_{agn}
C AGM immunisiert mit Leervektor und infiziert mit SIV_{agn}
D Rhesusaffen immunisiert mit SIV_{agn}GagCO und infiziert mit SIV_{mac}
E Rhesusaffen immunisiert mit SIV_{mac}GagCO und infiziert mit SIV_{mac}
F Rhesusaffen immunisiert mit Leervektor und infiziert mit SIV_{mac}

Durch die Abbildung 29 wird die vorangegangene Aussage bestätigt, den AGM 1-4 fehlt eine anamnestic humoral Immunantwort. Durch Subtraktion der SIV AK-Titer 2 Wochen nach Infektion und dem Tag der Infektion ergab sich die folgende Darstellung.

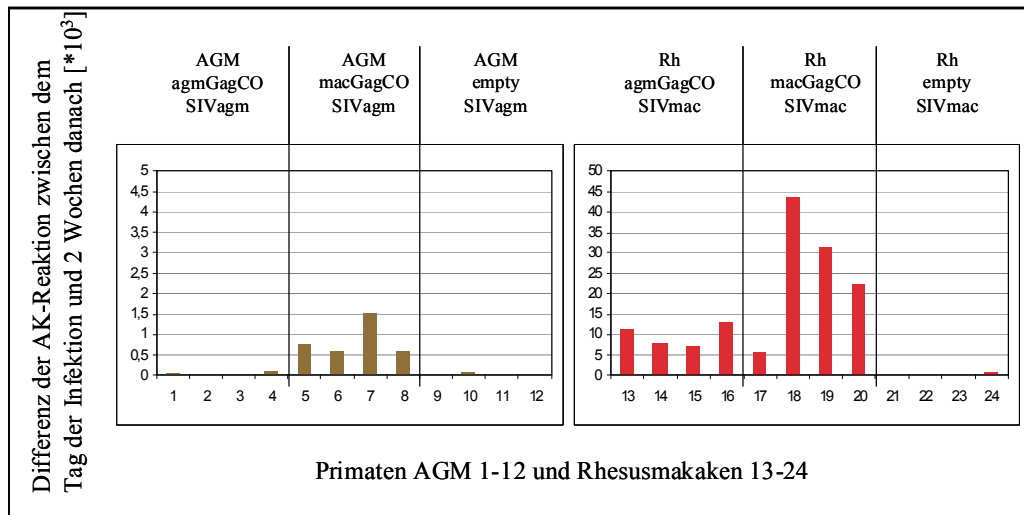


Abb. 29: Darstellung der humoralen anamnestic Immunantwort in **Grün** SIVagm⁺ AGM bzw **Rot** .SIVmac⁺ Rhesusmakaken

Die Möglichkeit mit dieser Darstellung den Grad der anamnestic Immunreaktion zu ermitteln, wird durch das Fehlen der Balken in den zwei Leervektorkontrollgruppen bestätigt. Die Leervektorkontrollgruppen können keine anamnestic Immunreaktion ausprägen, da sie vorher nie mit dem Antigen in Kontakt gekommen sind. Weiterhin ist die anamnestic Immunreaktion der Rhesusaffen induziert durch SIVmacGag wesentlich stärker als durch SIVagmGag. Daraus kann man schließen, dass die Induktion von kreuzreaktiven Gedächtnis B-Zellen eher schwächer ausgeprägt war.

3.3.3.2 antiGag-Antikörpertiter

Durch Verwendung von gereinigtem SIVagm bzw. SIVmac Gag wurden im ELISA nur antiGag-Antikörper detektiert, die teilweise gegenüber dem jeweilig anderen Antigen kreuzreagieren (Abb. 30 und 31).

Die antiGag-AK-Titer in den AGM der Kontrollgruppe (AGM 9-12) entsprachen den Erwartungen (Abb. 30), da es während einer natürlichen oder experimentellen Infektion zu keiner antiGag-Antikörper-Bildung in den AGM kommt. Bislang konnten nur antiGag-Antikörper kurzzeitig durch vorherige Immunisierung mit SIVagmGag-Protein induziert werden [105].

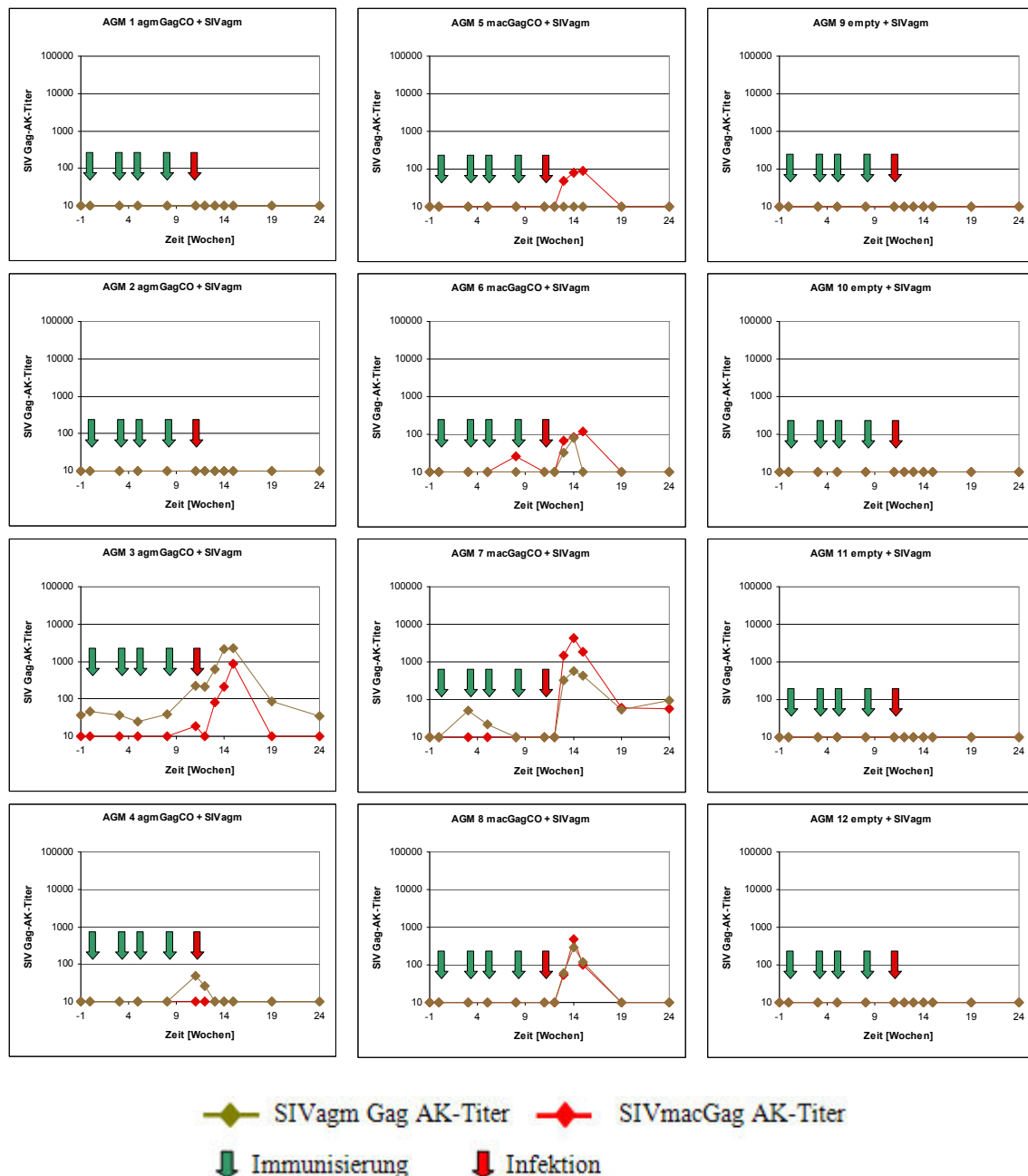


Abb. 30: Darstellung des Antikörpertiters aller AGM im Verlauf der Studie

Die Antikörpertiter in der ersten Immunisierungsgruppe waren sehr unterschiedlich ausgeprägt. Während in den AGM 1 und 2 keine antiSIVagmGag Antikörper induziert werden konnten, gelang eine starke Induktion von SIVagmGag-AK in AGM 3. Da Antikörper an Zeitpunkten nachgewiesen wurden, an denen noch keine Immunisierung erfolgte, kann der Schluss gezogen werden, dass dies unspezifische Bindungen beim ELISA sind, und somit ist die Basislinie des Titers leicht nach oben verschoben. Dennoch ist ein SIVagmGag-Antikörperpeak von 5×10^3 Antikörpern 4 Wochen nach Infektion zu verzeichnen, der zum Teil mit SIVmacGag kreuzreagierende Antikörper enthielt. Die AGM hatten nur zu SIVagmGag in Form von DNA und Vi-

rusprotein Kontakt, weshalb auch nur SIVagmGag-AK entstanden sein können. Ab Woche 14 der Studie ging der Antikörpertiter gen Basislinie. Bei AGM 4 traten kurzzeitig SIVagmGag Antikörper am Tag der Belastung auf, die aber sehr gering bei unter 10^2 Antikörpern lagen, bereits 2 Wochen nach Infektion nicht mehr nachweisbar waren und keine Kreuzreaktion zeigten.

In der zweiten Immunisierungsgruppe der AGM, in der alle Tiere SIVmacGagCO erhielten, entwickelten alle Tiere einen SIVmacGag-Antikörperpeak zwei Wochen nach Infektion. Diese Titer sanken danach wieder ab, bis in Woche 19 (AGM 5, 6 und 8) keine Antikörper mehr nachweisbar waren. AGM 7 besaß in Woche 24 noch einen Antikörpertiter, der wahrscheinlich im weiteren Verlauf bis unter die Nachweisgrenze absinken wird. Die Höhe der Peaks lag zwischen einem Antikörpertiter von 10^2 und 10^3 , bei AGM 7 bei 6×10^4 . Bis auf AGM 5 wiesen alle anderen AGM der zweiten Gruppe einen hohen Anteil an SIVagmGag Antikörpern auf, die wahrscheinlich teilweise kreuzreagierten. Bei der ersten Immunisierungsgruppe lagen die SIVagmGag-AK-Titer höher als die SIVmacGag-AK-Titer, dies ist bei der zweiten Gruppe umgekehrt, was allein auf die Unterschiede der Immunisierung zurückzuführen ist.

Generell lässt sich sagen, dass der Antikörpertiter in den AGM wesentlich geringer ist als bei den Rhesusmakaken und dieser sich bei den Rhesusaffen auf einem individuellen Niveau einpendelt, bei den AGM hingegen unter die Nachweisgrenze absinkt (Abb. 30 und 31).

Die Kontrollgruppe der Rhesusmakaken verhielt sich wie erwartet stark kontrastiert zur Leervektorgruppe der AGM. Während bei den AGM keinerlei SIVagmGag-AK-Titer auftraten, kam es bei den Rhesusaffen nach Infektion mit SIVmac zur Bildung von SIVmacGag-Antikörpern. Die Antikörpertiter gegen SIVmacGag stiegen bis jetzt stetig an und pendeln sich wahrscheinlich auf einem individuellen Niveau bei einem Antikörpertiter von 10^3 bis 10^4 ein (Abb. 31).

In der 4. Immunisierungsgruppe entwickelten sich SIVagmGag- und SIVmacGag-Antikörpertiter, die nach Infektion der Rhesusmakaken den gleichen Verlauf besitzen. Zuerst bildeten sich durch die SIVagmGagCO-Immunisierung Antikörper, die gegen das SIVagmGag gerichtet waren, zu sehen an dem etwas früher ansteigenden SIVagmGag-AK-Titer. Durch Infektion mit SIVmac bildeten sich zusätzlich noch SIVmacGag-Antikörper, die auf dem gleichen Niveau und zur gleichen Zeit wie die SIVagmGag-AK ihre höchsten Antikörpertiter von 10^4 erreichten. Danach sanken die Titer in gleichem Maße und pendelten sich auf einem individuellen Niveau ein. Bei Rh 13 war auffällig, dass der Antikörpertiter gen Null zu gehen scheint.

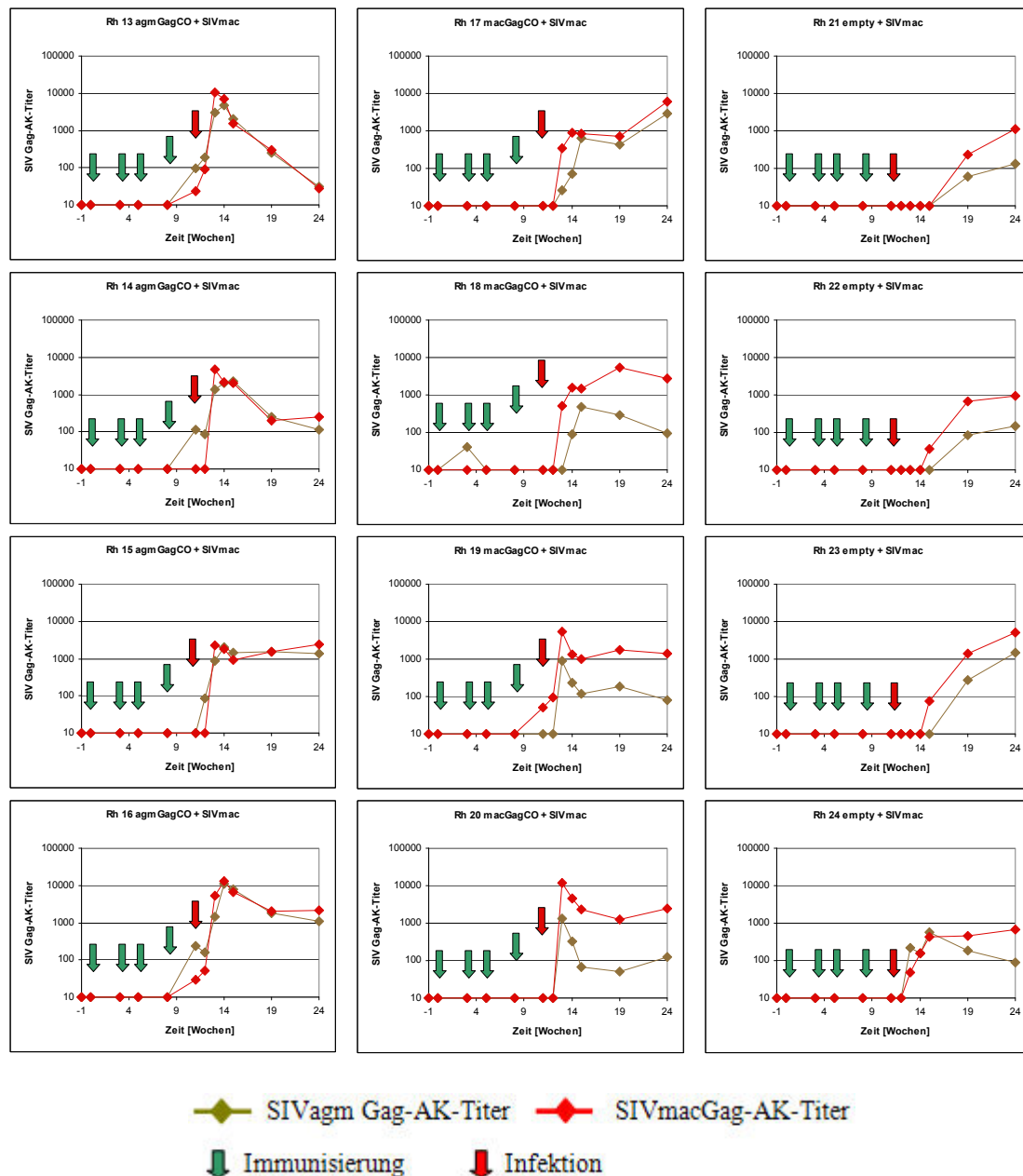


Abb. 31: Darstellung des Antikörpertiters aller Rhesusmakaken im Verlauf der Studie

In der Rhesusaffengruppe, die mit SIVmacGagCO immunisiert und mit SIVmac infiziert wurden, bildeten sich 2 Wochen nach Infektion SIVmacGag-AK heraus. Diese wiesen mit Ausnahme von Rh 17 einen um 1-1,5 Log-Stufen geringeren Titer an SIVagmGag kreuzreagierenden Antikörpern auf. Der Rh 17 bildete Antikörper, die fast zu 100 % mit SIVagmGag kreuzreagierten und 12 Wochen nach Infektion einen Titer von nahezu 10^4 zeigten. Rh 18 wies den Antikörperpeak 8 Wochen nach Infektion mit einem SIVmacGag-AK-Titer von 8×10^3 auf, die teilweise mit SIVagmGag kreuzreagierten. Der SIVmacGag-Antikörpertiter sank danach auf 5×10^3 ab. Die Antikörpertiter von Rh 19 und 20 verhielten sich sehr ähnlich, haben einen Peak bei 10^4 2 Wochen nach Infektion und sanken dann auf ein individuelles Niveau bei einem Antikörpertiter von $1,1 \times 10^3$ (Rh 19) bzw. 5×10^3 (Rh 20).

3.3.3.3 antiOvalbumin-Antikörpertiter

Ein Tier jeder Gruppe erhielt als interne Kontrolle zusätzliche Immunisierungen mit *ova* DNA, im gleichen Maße wie die Immunisierungs-DNA coimmobilisiert mit speziesspezifischem *gmc*sf. Die OVA-Antikörpertiter sind in folgender Abbildung dargestellt.

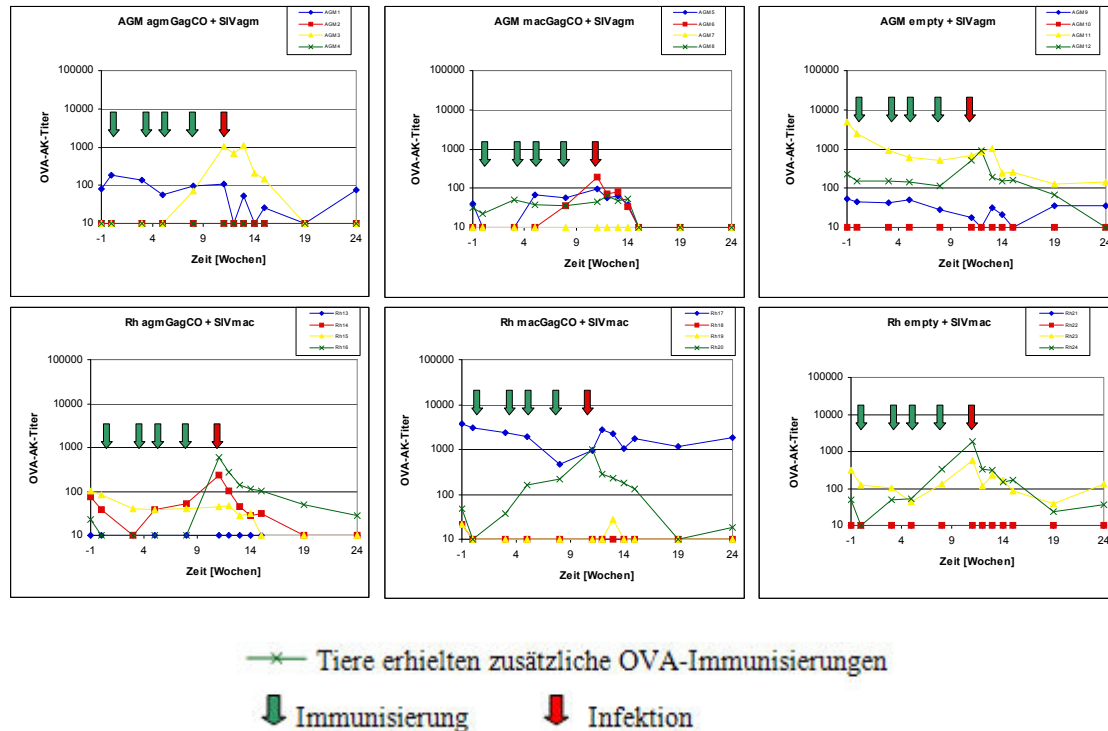


Abb. 32: Darstellung der OVA-Antikörpertiter aller Primaten im Verlauf der Studie

Die Antikörper gegen OVA entsprachen in keiner Weise den Erwartungen. Theoretisch sollten nur bei den Tieren Antikörper detektiert werden, die mit *ova* immunisiert wurden. Die Antikörpertiter ließen keinerlei Korrelation zum Versuchsaufbau und -ablauf zu. Nach Literaturrecherchen ergab sich, dass 90 % der Menschen und 44 % der Squirrel Monkeys (*Saimiri sciureus*) positiv für antiOVA-IgG sind [165, 166]. Dies wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt (Abb. 32) und könnte erklären, wie diese Antikörpertiter zustande kommen. Somit ist OVA als Kontrollantigen in Primatenversuchen bezüglich der Antikörperantwort ungeeignet.

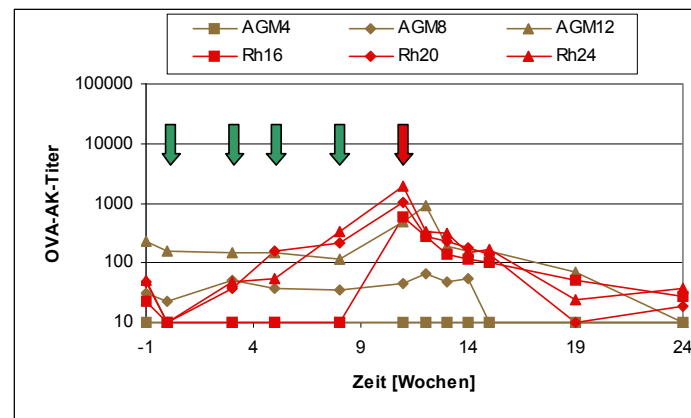


Abb. 33: Darstellung aller Primaten, die zusätzliche Immunisierungen mit OVA erhielten;
Grüner Pfeil Immunisierung **Roter Pfeil** Infektion

Dennoch ist verwunderlich, weshalb alle drei Rhesusmakaken zum Tag der Virusbelastung einen OVA-Antikörperpeak aufwiesen (Abb. 33). Bei den AGM ist dieses Phänomen nicht ausgeprägt.

3.3.4 Detektion spezifischer T-Zellen

Durch Stimulation der isolierten PBMC mit überlappenden Peptiden, die das ganze SIVagmGag-Protein umfassen, konnten spezifische T-Zellen detektiert werden. Das Vorkommen von spezifischen T-Zellen gegen das Kernprotein von SIVagm bei den AGM konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, da natürlich oder experimentell langzeitinfizierte AGM keine SIVagmGag-spezifischen T-Zellen aufweisen (Abb. 34). Auch Tiere, die vor SIVagm-Infektion mit SIVagm-Gag-Protein immunisiert wurden, zeigten keine Gag-spezifischen T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

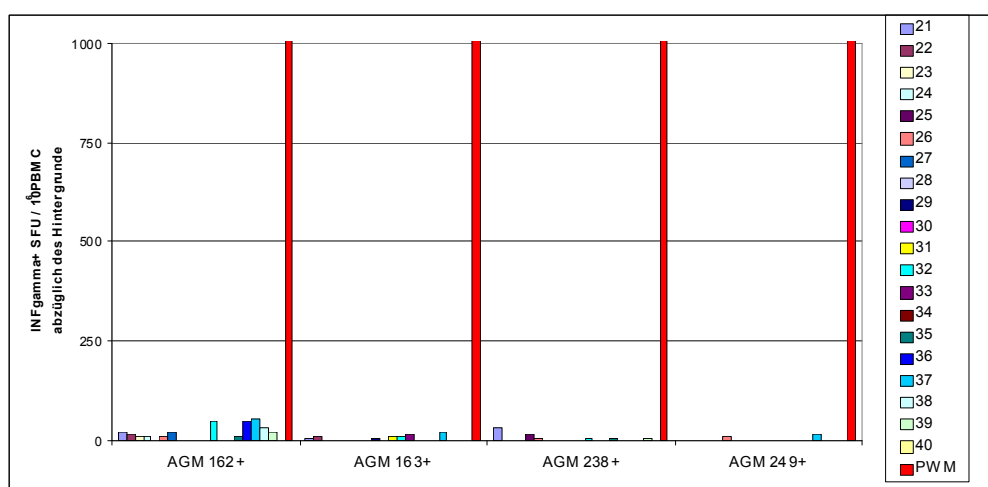


Abb. 34: Reaktion der PBMC langjährig SIVagm infizierter AGM auf SIVagmGag-Peptidpools; positiv Kontrolle war die Stimulation mit Pokeweed-Mitogen (PWM)

3.3.4.1 Darstellung der spezifischen T-Zellen im Verlauf der Studie am Beispiel AGM 2 und Rh 14

Der Immunisierungserfolg der Primaten zeigte sich schon nach der ersten DNA-Immunisierung. Es wurden SIVagmGag-spezifische T-Zellen gebildet, die mittels ELISpot-Assay nachgewiesen wurden (Abb. 35). Bei beiden Primatenspezies stieg die Anzahl der spezifischen T-Zellen kontinuierlich durch die Gabe weiterer DNA-Dosen an. Selbst die 4. Immunisierungsdosis bewirkte eine Steigerung der Anzahl an SIVagmGag spezifischen T-Zellen, zumindest bei den Rhesusaffen. In den AGM hingegen sank die Anzahl der SIVagmGag-spezifischen T-Zellen nach der dritten Immunisierungsdosis ab. Dieser Trend setzte sich weiterhin fort, bis 12 Wochen nach Infektion (Studienwoche 24) in den AGM nur noch wenige spezifische T-Zellen vorhanden waren. In Rhesusmakaken hingegen blieben die SIVagmGag-spezifischen T-Zellen erhalten. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Affenspezies liegt in der Höhe der spezifischen Reaktion gegen das SIVagmGag-Protein. Die Anzahl der spezifischen T-Zellen war teilweise bis zu sechsfach so hoch wie bei den AGM, pendelte sich aber bei einem vierfachen Wert ein.

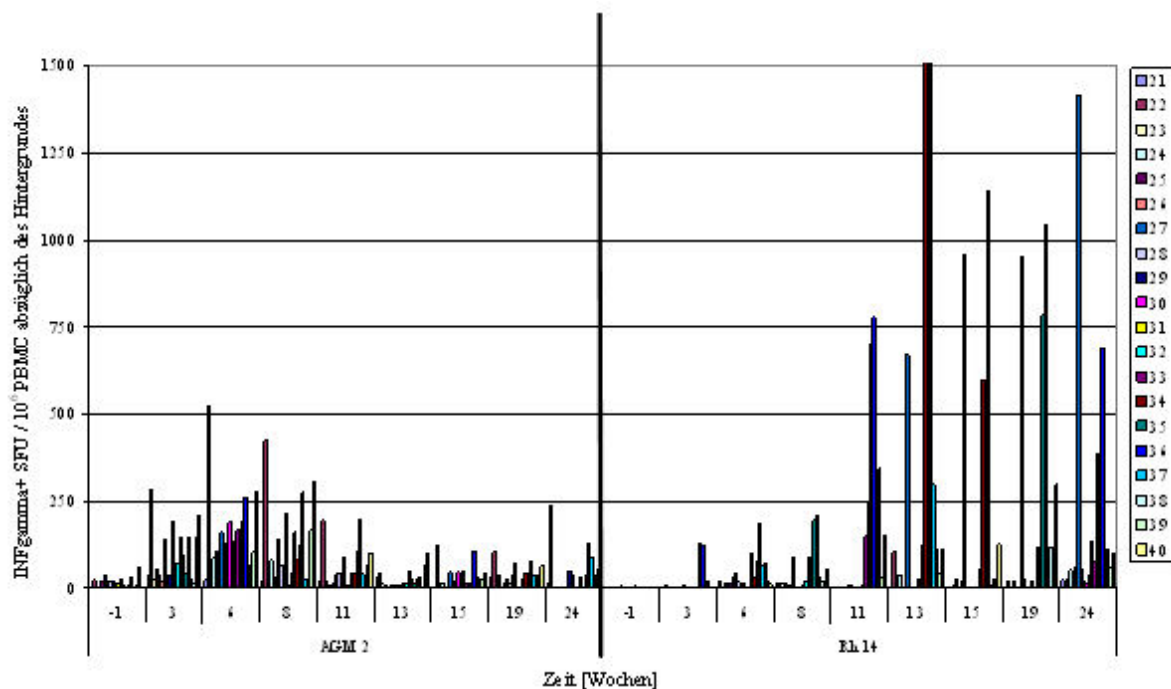


Abb. 35: Reaktion der PBMC auf SIVagmGag Peptidpools im Verlauf der Studie beispielhaft am AGM 2 und Rh 14, beide Tiere wurden mit SIVagmGagCO immunisiert

Bei beiden Primatenspezies setzten sich die immunodominanten Epitope bei voranschreitender Zeit durch. Das bedeutet, dass sich einzelne korrespondierende Peptidpools sehr stark von den anderen hervorgerufenen Reaktionen unterschieden. Mittels dieser immunodominanten Peptid-

pools war es möglich, die immunodominanten Epitope zu identifizieren und näher zu charakterisieren (Abschnitt 3.3.7).

3.3.4.2 Darstellung spezifischer T-Zellen total

Die Auswertung und Darstellung der gesamten T-Zell-Reaktionen war aufgrund der enormen Datenmenge am anschaulichsten, wenn eine Addition aller spezifischen SFU, die oberhalb von 50 SFU / 10^6 PBMC lagen, erfolgte. Dieser Wert wurde anschließend durch zwei geteilt, da jedes Peptid in jeweils zwei Peptidpools vorhanden ist und so die Reaktion auf das gesamte einfache Peptidset gezeigt werden konnte.

In Abbildung 36 sind die totalen spezifischen T-Zellzahlen gegen die Peptidpools, die der Aminosäure-Sequenz der Immunisierungs-DNA entsprechen, aller Primaten dieser Studie im zeitlichen Verlauf gezeigt. Allgemein kann man sagen, dass die Immunisierung schon nach der ersten DNA-Gabe erfolgreich war und zum Anstieg der Gesamtheit an spezifischen T-Zellen sowohl bei den AGM als auch bei den Rhesusaffen führte.

Die Reaktion des Immunsystems gegen die durch die Immunisierungs-DNA gebildeten Proteine ließ in der ersten AGM-Gruppen (Abb. 36A) nach der dritten Immunisierung nach und blieb, abgesehen von AGM 4, unberührt von der Infektion. In Gruppe 2 der AGM (Abb. 36B) stieg die Gag-spezifische Immunantwort bis kurz nach Infektion an. Während die spezifische zelluläre Immunantwort nach Infektion in Gruppe 1 gen Null ging, pendelte diese sich bei Gruppe 2 auf einem individuellen Niveau ein, was daraufhin deutet, dass in Gruppe 2 Gedächtnis-T-Zellen induziert werden konnten.

Bei beiden Gruppen der Rhesusmakaken (Abb. 36D und E) stieg die Immunreaktion gegen das gesamte SIVGag-Peptid-Set selbst nach der 4. Immunisierung noch an, ergab einen Peak bei 2 Wochen nach Infektion, sank dann ab und pendelte sich auf einem individuellen Niveau ein. Das bedeutet, dass in diesen Gruppen eine anamnestic Immunantwort kurz nach Infektion auftrat und Gag-spezifische Gedächtnis-T-Zellen induziert werden konnten.

In den Leervektorkontrollgruppen (Abb. 36C und F) war erst nach Infektion eine T-Zellreaktion gegen die SIVagmGag- und SIVmacGag-Peptidpools messbar. Diese stieg bis zur zweiten bzw. 4. Woche nach Infektion an und pendelte sich dann auf dem jeweils individuellen Niveau ein. Der Peak 2-4 Wochen nach Infektion war zwischen den beiden Kontrollgruppen ähnlich, aber im Vergleich zu den Immunisierungsgruppen wesentlich geringer. Das Virus ohne vorherige Immunisierung war in der Lage, in gleichem Maße Gedächtnis T-Zellen zu induzieren wie in den anderen Gruppen. Da in langzeitinfizierten AGM keine Gag-spezifischen T-Zellen gefunden werden, scheint die Infektion nur eine Wirkung auf die Zeit kurz nach Infektion zu haben. Theoretisch

sollte die Anzahl an Gag-spezifischen T-Zellen in den AGM 9-12 im Laufe der Zeit auf das Nullblutniveau sinken.

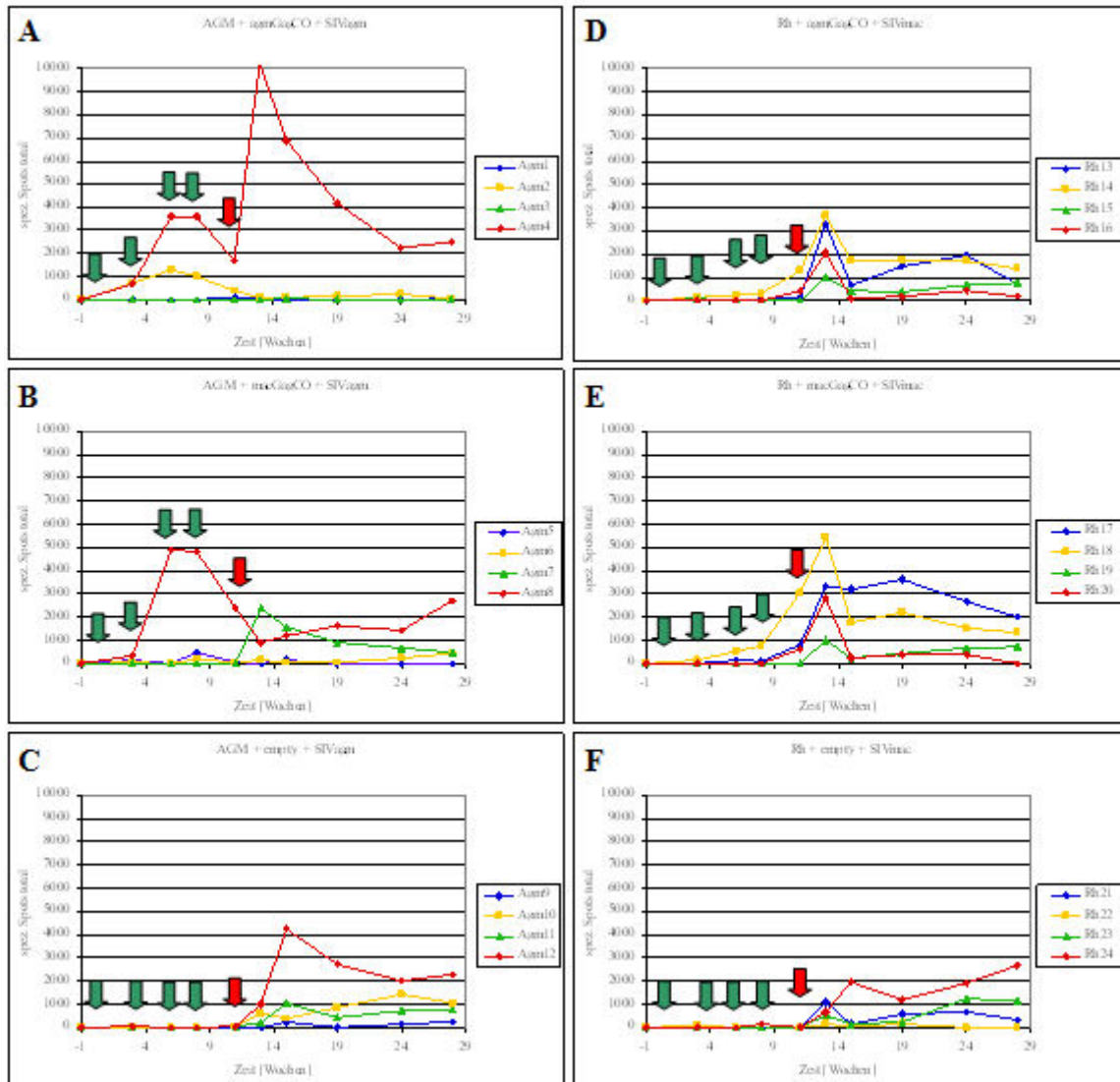


Abb. 36: Übersicht des Verlaufs der SIVGag-spezifischen T-Zellen aller Primaten dieser Studie
Immunsierung **Grüner Pfeil** , Infektion **Roter Pfeil**

- A:** Reaktion der PBMC von agmGagCO immunisierten AGM auf SIVagmGag-Peptidpools
B: Reaktion der PBMC von macGagCO immunisierten AGM auf SIVmacGag-Peptidpools
C: Reaktion der PBMC von Leervektor immunisierten AGM auf SIVagmGag- und SIVmacGag-Peptidpools
D: Reaktion der PBMC von agmGagCO immunisierten Rhesusmakaken auf SIVagmGag- Peptidpools
E: Reaktion der PBMC von macGagCO immunisierten Rhesusmakaken auf SIVmacGag-Peptidpools
F: Reaktion der PBMC von Leervektor immunisierten Rhesusmakaken auf SIVagmGag- und SIVmacGag-Peptidpools

In der Abbildung 36 auffällig sind die AGM 4, 8 und 12 (rote Linie), die eine deutlich erhöhte Reaktion gegen die Gag-Peptidpools aufweisen, die AGM 4 und 8 schon zu Beginn der Immunsierung, der AGM 12 erst nach SIVagm-Infektion. Zusätzlich tritt bei AGM 4 nach Infektion eine anamnestiche Immunantwort auf, die bei den anderen Tieren der Gruppen fehlt. Interessanter-

weise waren die AGM 4, 8 und 12 genau jene Primaten, die zusätzlich die gleiche Menge an OVA-DNA wie die eigentliche Immunisierungs-DNA erhielten. Aufgrund dieser Daten würde sich eine immunsteigernde Wirkung von OVA-DNA vermuten lassen, die aber durch die geringe Anzahl an Versuchstieren nicht eindeutig zu belegen und auch nicht zu erklären ist. Bei den Rhesusaffen fehlte diese Wirkung gänzlich. Bemerkenswert ist auch das Fehlen einer T-Zell-Antwort gegen die OVA-Peptidpools bei beiden Primatenspezies, die eigentlich bei erfolgreicher Immunisierung messbar sein sollte.

Die Gruppe 1 (Ausreißer AGM 4 ausgenommen) ist gegenüber den anderen Immunisierungsgruppen insofern auffällig, da hier weder eine anamnestiche Immunantwort auftrat noch Gedächtnis-T-Zellen induziert werden konnten. Die durch die Immunisierungs-DNA pTH-SIVagmGagCO gebildeten Proteine konnten eine anamnestiche Immunantwort in Rhesusmakaken induzieren, nicht aber in AGM. Weiterhin sind die AGM zumindest befähigt, eine humorale anamnestiche Immunantwort auszubilden, wie in Gruppe 2 zu sehen ist (Abb. 29). Auch konnten in diesen AGM, immunisiert mit SIVmacGagCO, Gedächtnis-T-Zellen induziert werden, was in Gruppe 1 fehlgeschlug. Es konnte in den AGM keine zelluläre anamnestiche Immunantwort nachgewiesen werden, was in folgende Abbildung bestätigt wird. Die Differenzbildung des Tages der Infektion und 2 Wochen nach Infektion resultiert bei Vorliegen einer anamnestiche Reaktion im Vorhandensein von Balken im Diagramm. Fehlen diese, fehlt auch eine anamnestiche Immunantwort. Abgesehen von AGM 4 und 7 zeigen Gruppe 1 und 2 die Abwesenheit einer zellulären anamnestiche Immunantwort, wie auch die Leervektorkontrollgruppen beider Spezies.

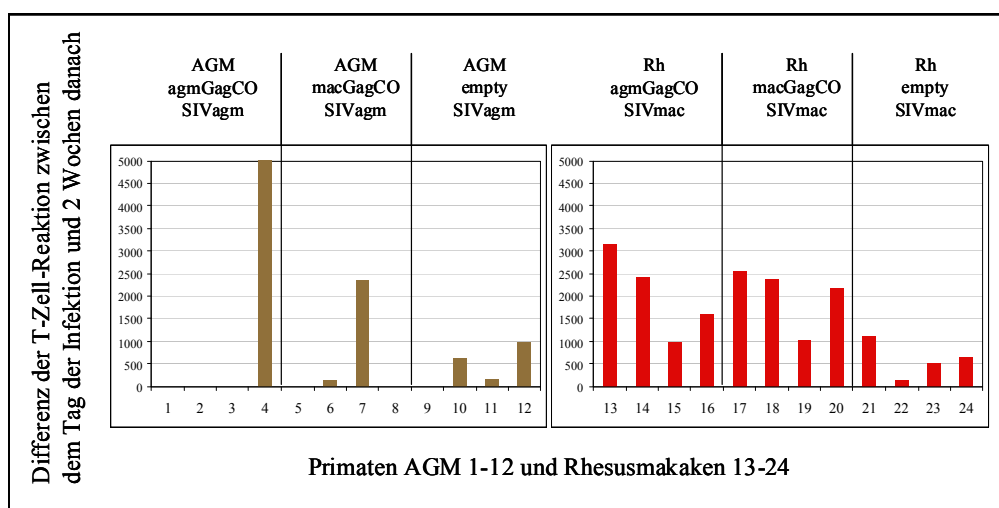


Abb. 37: Darstellung der anamnestiche zellulären Immunantwort in **Grün** SIVagm⁺ AGM bzw **Rot** SIVmac⁺ Rhesusmakaken

Trotz der ausgeprägten anamnestiche Immunreaktion auf humoraler und zellulärer Ebene in den Rhesusmakaken, ist durch die Immunisierung mit *gag* DNA aufgrund von früheren Experimenten in Rhesusmakaken kein Impfschutz zu erwarten.

3.3.5 Kartierung der CTL-Epitope in AGM und Rhesusaffen

Durch Auswertung der verschiedenen 15mer Peptidpools und Analyse der in allen Pools enthaltenen Einzelpeptide wurden die vermutlich spezifischen Einzelpeptide im ELISpot-Assay getestet. In Abbildung 38 sind diese Reaktionen der PBMC verschiedener AGM gezeigt.

Der AGM 4 reagierte stark spezifisch auf das Peptid Nr. 10 (SIVagmGag10₍₄₆₋₆₀₎ LHERLLESEEGCKKI), schwächer, aber dennoch spezifisch auf das Peptid Nr. 6 (SIVagmGag6₍₂₆₋₄₀₎ KKKYQIKHLIWAGKE) und nicht auf ein unspezifisches SIVagmGag-Peptid (SIVagmGag3₍₁₁₋₂₅₎ RQLDKFEHRLRPTG) (Abb. 38A). Die Reaktion auf das Peptid Nr. 5 war nicht signifikant.

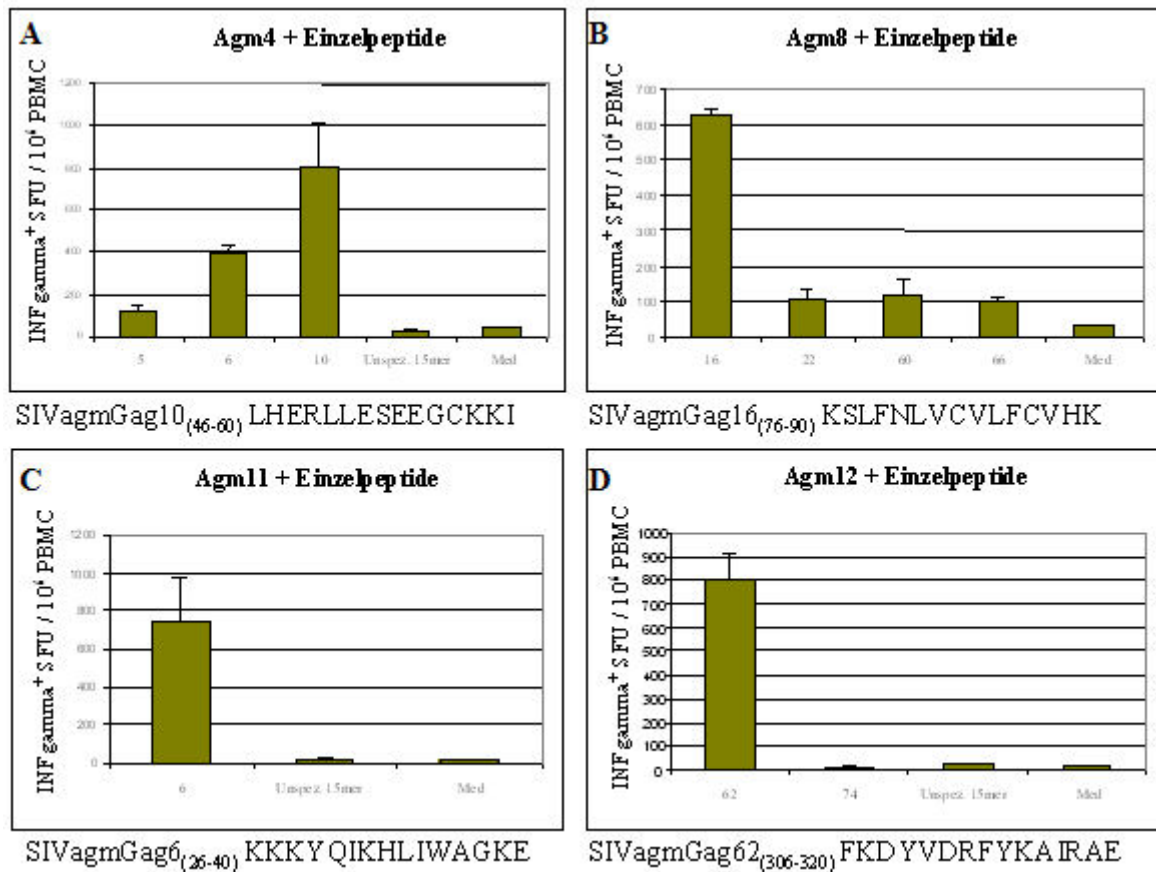


Abb. 38: ELISpot-Assay mit Einzelpeptidstimulation bei einzelnen AGM, 8 Wochen nach Infektion

- A: PBMC von AGM 4, stimuliert mit 15mer Einzelpeptiden Nr. 5, 6 und 10
- B: PBMC von AGM 8, stimuliert mit 15mer Einzelpeptiden Nr. 16, 22, 60 und 66
- C: PBMC von AGM 11, stimuliert mit 15mer Einzelpeptid Nr. 6
- D: PBMC von AGM 12, stimuliert mit 15mer Einzelpeptiden Nr. 62 und 74

Der AGM 8 reagierte spezifisch auf das 15mer SIVagmGag16₍₇₆₋₉₀₎ KSLFNLVCVLFCVHK, in welchem das immunodominante Epitop SLYNTVATL von HIV-1_{HXB2} für den humanen Haplotyp HLA*A02 mit Sequenzvariationen zu erkennen ist (Abb. 38B). Die Reaktion auf die Peptide Nr. 22, 60 und 66 war nicht signifikant.

In Abb. 38C ist die spezifische zelluläre Reaktion des AGM 11 gegen das Peptid SIVagmGag₆₍₄₆₋₆₀₎ KKKYQIKHLIWAGKE gezeigt. Es erfolgte keine Reaktion gegen das unspezifische SIVagmGag-Peptid Nr. 3.

Die PBMC des AGM 12 reagierten stark spezifisch auf das Peptid SIVagmGag₆₂₍₃₀₆₋₃₂₀₎ FKDYVDRFYKAIRAE (Abb. 38D). Es erfolgte weder eine Reaktion auf das Peptid Nr. 74 noch auf das unspezifische SIVagmGag-Peptid Nr. 3.

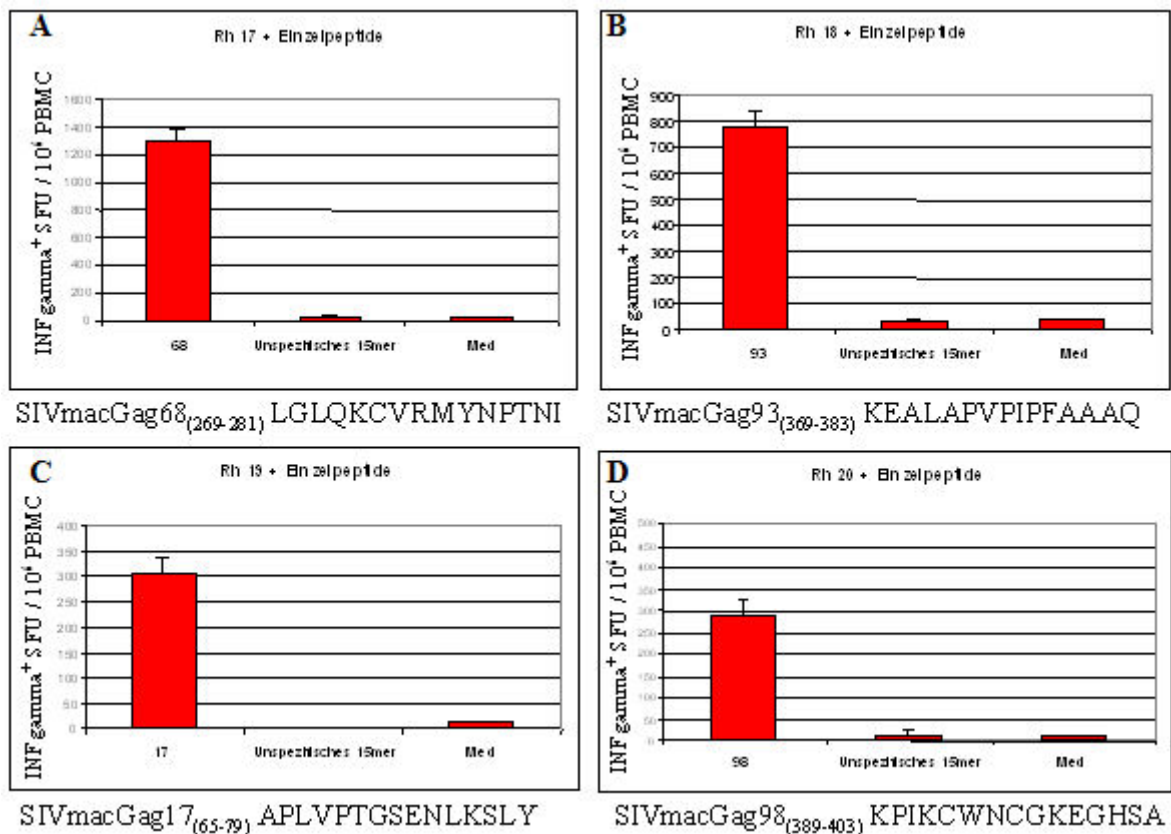


Abb. 39: ELISpot-Assay mit Einzelpeptidstimulation bei einzelnen Rhesusaffen, 8 Wochen nach Infektion

- A: PBMC von Rh 17, stimuliert mit 15mer Einzelpeptid Nr. 68
- B: PBMC von Rh 18, stimuliert mit 15mer Einzelpeptid Nr. 93
- C: PBMC von Rh 19, stimuliert mit 15mer Einzelpeptid Nr. 17
- D: PBMC von Rh 20, stimuliert mit 15mer Einzelpeptid Nr. 98

Die zelluläre Immunantwort verschiedener Rhesusaffen auf Einzelpeptidstimulationen sind in Abb. 39A-D gezeigt und zeigen hohe Signifikanz gegenüber dem unspezifischen SIVmacGag₃₍₉₋₂₃₎-Peptid mit der Aminosäuresequenz SGKKADELEKIRLRP. Rh 17 reagierte stark spezifisch auf das Peptid SIVmacGag₆₈₍₂₆₉₋₂₈₁₎ LGLQKCVRMYNPTNI, Rh 18 auf SIVmacGag₉₃₍₃₆₉₋₃₈₃₎ KEALAPVPIPFAAAQ, Rh 19 auf SIVmacGag₁₇₍₆₅₋₇₉₎ APLVPTGSENKLSLY und Rhesusaffe 20 auf SIVmacGag₉₈₍₃₈₉₋₄₀₃₎ KPIKCWNCGKEGHSA.

3.3.6 Reaktion der T-Zellen auf das Gag-Protein des Belastungsvirus

Zwischen den beiden Kernproteinen von SIVagm und SIVmac besteht nur 70 % Homologie, weshalb die Reaktion auf das Gag-Protein des Belastungsvirus, wenn es nicht dem Immunisierungsagenz entsprach, interessant ist. In den beiden Primatengruppen AGM 5-8 (immunisiert mit SIVmacGagCO, infiziert mit SIVagm) und Rh 13-16 (immunisiert mit SIVagmGagCO, infiziert mit SIVmac) zeigten sich nach Durchführung des ELISpot-Assays starke stringente Reaktionen auf bestimmte Peptidpools. Diese Peptidpools gehen auf bestimmte immunodominante Peptide zurück, welche natürlich aufgrund vermuteter unterschiedlicher Haplotypen bei den einzelnen Primaten abweichen.

So konnte bei den Rh 13 und 15 ein Peptid (SIVmacGag45₍₁₇₇₋₁₈₉₎ LSEGCTPYDINQMLN, SIVmacGag46₍₁₈₁₋₁₉₃₎ CTPYDINQMLNCVGD) identifiziert werden, welches schon früher als CM9-Peptid in der Literatur beschrieben [167] dem Haplotyp Mamu*A01 zuzuordnen ist und der Sequenz CTPYDINQM entspricht (Abb. 40). Auch der Rhesusaffe 14 weist auf ein immunodominantes Epitop mit der Aminosäuresequenz QNANPDCKLVL (SIVmacGag81₍₃₂₁₋₃₃₃₎ TLIQNANPDCKLVL, SIVmacGag82₍₃₂₅₋₃₃₇₎ QNANPDCKLVLKGLG) hin. Dieses wurde bislang nicht in der Literatur beschrieben.

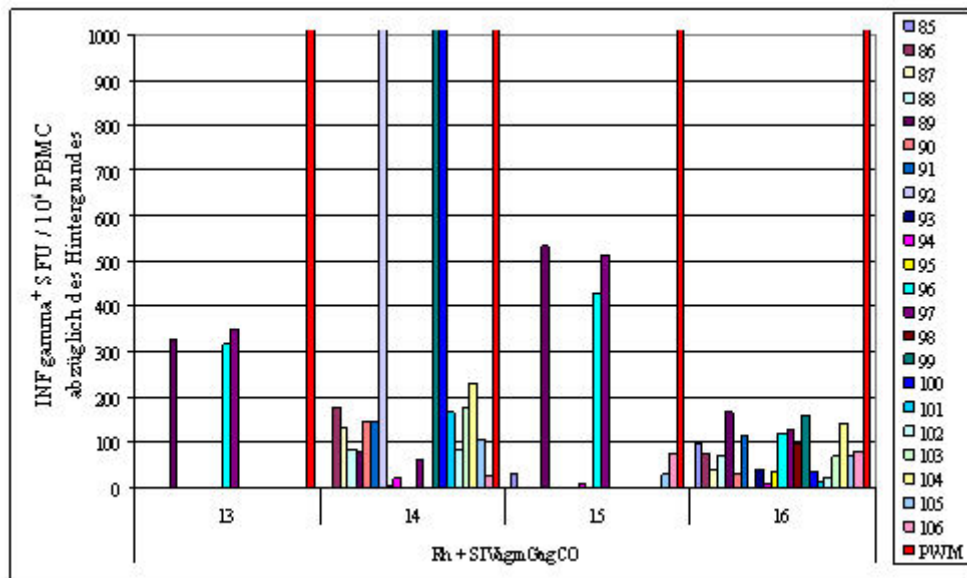


Abb. 40: Spezifische CTL-Reaktion gegen die Virus-Gag-Peptidpools 8 Wochen nach Infektion, Rhesusmakaken immunisiert mit SIVagmGagCO und infiziert mit SIVmac

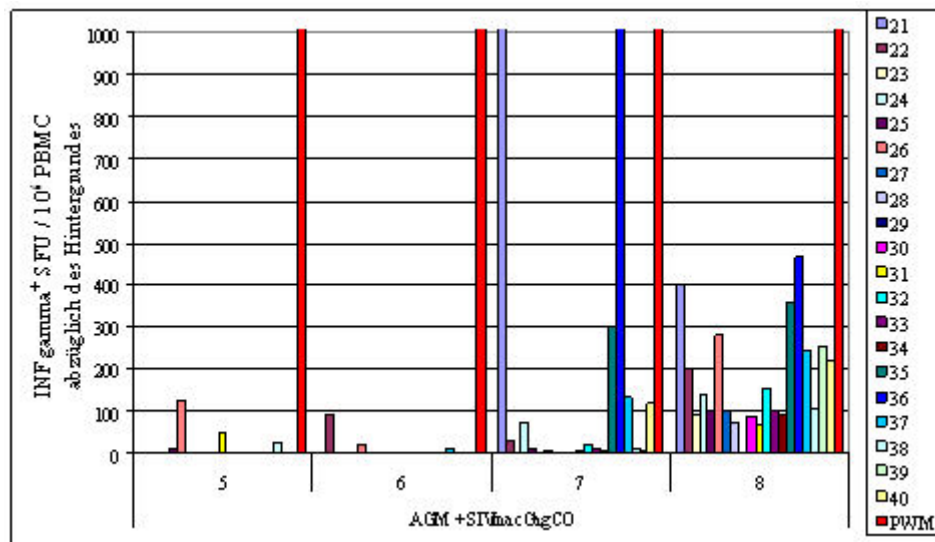


Abb. 41: Spezifische CTL-Reaktion gegen die Virus-Gag-Peptidpools 8 Wochen nach Infektion, AGM immunisiert mit SIVmacGagCO und infiziert mit SIVagm

Aufgrund der Reaktionen gegen die Peptidpools (Abb. 41), die das Peptid SIVagmGag₆₍₂₆₋₄₀₎ KKKYQIKHLIWAGKE enthielten, ist es möglich AGM 7 und 8 einem gemeinsamen MHC-I-Typ zuzuordnen, wenn auch eine exakte Klassifizierung nicht möglich ist. Für die AGM sind nur wenige MHC-Typen beschrieben, und in dieser Studie ließen sich zum ersten Mal Epitope gegen SIVagmGag identifizieren.

Rhesusmakaken lassen sich auch anhand von Peptidstimulationen einem MHC-I-Typ zuordnen, was in folgender Abbildung gezeigt wird.

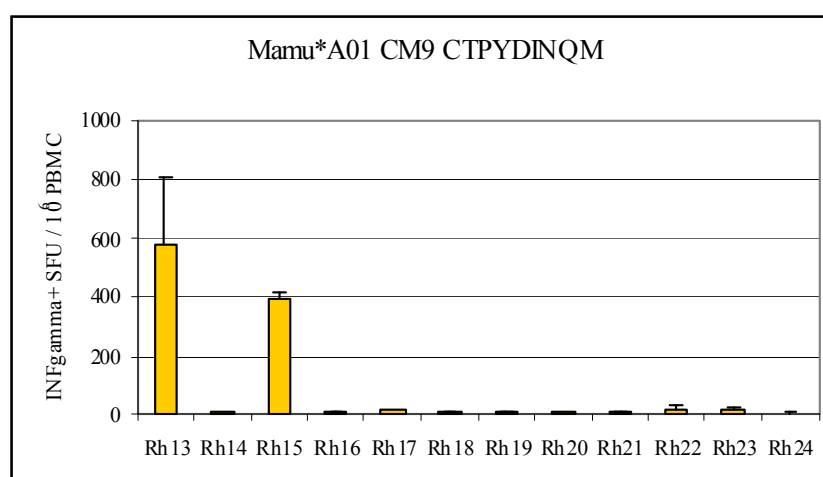


Abb. 42: Mamu*A01 Kartierung anhand des CM9-Peptides

Eine signifikante Anzahl an PBMC des Rh 13 reagierten mit INFgamma-Produktion, detektiert durch den ELISpot-Assay, während die anderen getesteten Rhesusaffen keine Signifikanz zeigten und sich deshalb nicht dem Haplotyp Mamu*A01 zuordnen lassen (Abb. 42).

3.3.7 Feinkartierung von MHC-I-Epitopen in AGM und Rhesusmakaken

Nach der Kartierung der MHC-I-Epitope mit 15meren kann eine Feinkartierung mit Nonameren oder Dekameren, die jeweils um eine Aminosäure zum C-Terminus verschoben sind, das Epitop begrenzen. In der folgenden Abbildung ist die Feinkartierung am Beispiel des SIVagmGag₂₆₋₄₀ im AGM 7 und des SIVmacGag₆₅₋₇₉ im Rh 19 gezeigt:

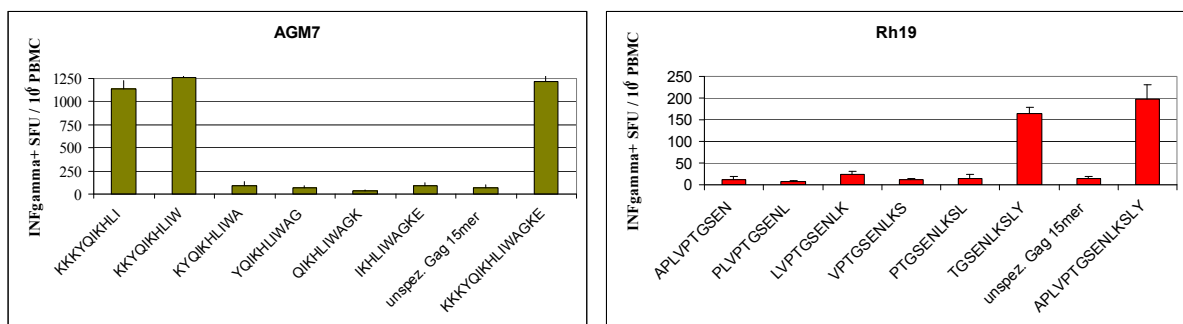


Abb. 43: MHC-I-Epitop-Feinkartierung am Beispiel AGM 7 und Rh 19

Während die Dekamere SIVagmGag₂₆₋₃₅ KKKYQIKHLI und SIVagmGag₂₇₋₃₆ KKYQIKHLIW an das MHC-I-Molekül banden, konnte durch die Abstinenz des Lysins (Einbuchstaben-Code K) an der Stelle 27 des Gag-Proteins keine Bindung mehr erzielt werden. Somit ist das Nonamer KKYQIKHLI (SIVagmGag₂₇₋₃₅) als das MHC-I-Epitop des AGM 7 genau definiert. Mit Hilfe aller sechs Dekamere des 15mers SIVmacGag₆₅₋₇₉ APLVPTGSENKSLY war es möglich, das Dekamer TGSLENKSLY (SIVmacGag₇₀₋₇₉) als Epitop in Rh 19 zu kartieren. Bei diesem Peptid scheinen die Aminosäuren Threonin am Anfang und Tyrosin am Ende für die Bindung ans MHC-I-Molekül nötig zu sein, da ein Peptid ohne Threonin bzw. Tyrosin keine INFγ-Produktion in den Zellen auslöst. Die weiteren kartierten Epitope der Primaten, in denen eine Kartierung möglich war, sind in Tabelle 25 zusammengefasst:

Tabelle 25: Übersicht kartierte Epitope in AGM und Rhesusmakaken, Lage der Epitope Anhang X

Primaten	Sequenz des Epitops und Ort im Gag Protein	Länge des Epitops [AS]	kein kleineres Epitop möglich
AGM 4	SIVagmGag26-40 KKKYQIKHLIWAGKE	15	
AGM 7	SIVagmGag27-35 KKYQIKHLI	9	x
AGM 8	SIVagmGag76-90 KSLFNLVCVLFVHK	15	
	SIVagmGag26-40 KKKYQIKHLIWAGKE	15	
AGM 10	SIVagmGag29-37 YQIKHLIWA	9	x
	SIVagmGag277-285 RWIILGLQK	9	x
AGM 11	SIVagmGag27-35 KKYQIKHLI	9	x
AGM 12	SIVagmGag309-317 YVDRFYKAI	9	x
Rh 13	SIVmacGag181-195 CTPYDINQM	9	x
Rh 14	SIVmacGag325-334 QNANPDCKLV	10	x
Rh 15	SIVmacGag181-195 CTPYDINQM	9	x
Rh 17	SIVmacGag274-283 CVRMYNPTNI	10	x
Rh 18	SIVmacGag371-379 ALAPVPIPF	9	x
Rh 19	SIVmacGag70-79 TGSENLKSLY	10	x
Rh 20	SIVmacGag389-403 KPIKCWNCGKEGHS	15	

3.3.8 Plasmaviruslast im Verlauf der Studie

Durch die Plasma- bzw. Proviruslastbestimmung wurde die Infektion von AGM und Rhesusmakaken nachgewiesen (Abb. 44). Wie erwartet, ähnelt der Verlauf und die Magnitude der Plasmaviruslast der AGM denen der Rhesusmakaken. Dies deutet darauf hin, dass nicht der Unterschied in der Virusbelastung die Erklärung für die Apathogenität ist, sondern es dafür eine andere Ursache geben muss.

Zwei bis drei Wochen nach Infektion kam es zum Viruspeak, welcher bei den AGM der ersten Immunisierungsgruppe zwischen 5×10^4 und 5×10^5 SIVagm Kopien/ml Plasma lag. Nach einem Absinken der Viruslast pendelte sich die Plasmaviruslast zwischen 10^3 und 10^4 Viruskopien/ml Plasma ein. In der zweiten Immunisierungsgruppe der AGM lag der Plasmaviruspeak ähnlich, allerdings pendelte sich die Viruslast nach dem Absinken auf einem etwas höheren Niveau bei $1-5 \times 10^4$ SIVagm Kopien/ml Plasma ein. Bis auf den Ausreißer AGM 10 hatten die Tiere der Leervektorkontrolle einen SIVagm Plasmaviruspeak von $0,5-1 \times 10^5$ Viruskopien/ml Plasma 2-3 Wochen nach Infektion. Danach stellte sich ein Plateau um die 10^3 Viruskopien/ml oder weniger ein. AGM 10 weicht ein wenig von dem Durchschnitt ab, da der Viruspeak sehr schwach bei $3,5 \times 10^3$ war und somit gerade die Nachweisgrenze überschritten wurde. Am Anfang der Studie waren alle Tiere SIVagm negativ.

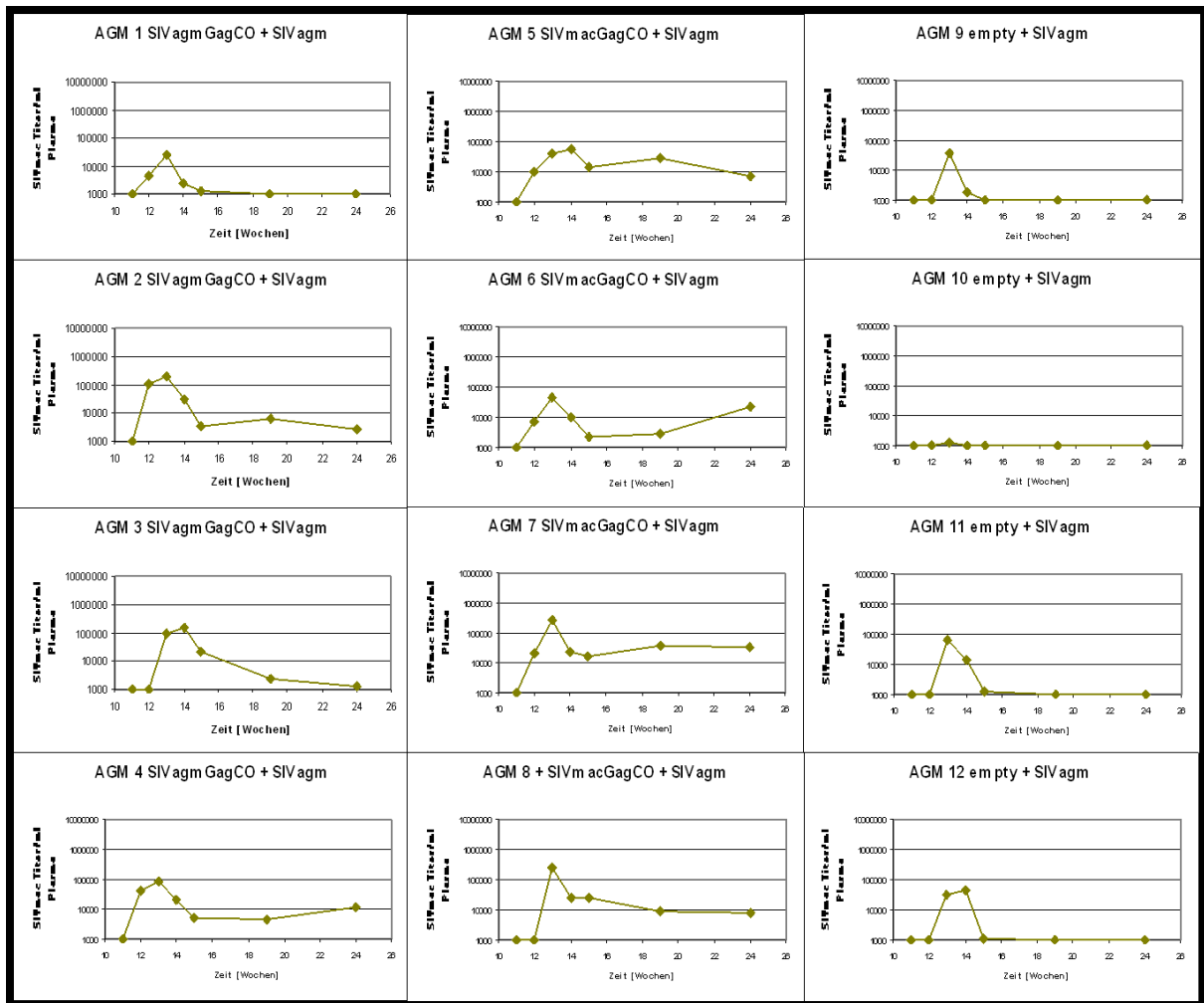


Abb. 44: Darstellung der Plasmaviruslast aller AGM im Verlauf der Studie ab dem Tag der SIVagm Infektion [SIVagm Virus/ml Plasma] bis 13 Wochen nach Infektion

Letztendlich konnte in allen AGM die SIVagm Infektion nachgewiesen werden.

Die Plasmaviruslast bei den Rhesusmakaken verhielt sich im Laufe der Studie wie erwartet, ein starker Anstieg eine Woche nach Infektion, mit einem Peak meistens in der 2 Wochen nach Infektion und nach einem Absinken der Viruslast im Plasma auf ein individuelles Niveau zwischen 10^3 - 10^5 Viruskopien/ml (Abb. 45). Am Anfang der Studie waren alle Tiere SIVmac negativ.

Der Viruspeak in der ersten Immunisierungsgruppe lag zwischen 2×10^4 und 2×10^5 Viruskopien/ml, in der SIVmacGagCO-Immunisierungsgruppe zwischen 1 - 4×10^5 Viruskopien/ml und in der Leervektorkontrollgruppe bei $2,9 \times 10^4$ - 2×10^5 Viruskopien/ml Plasma. Dies entsprach den Erwartungen und ist zwischen den einzelnen Gruppen nicht statistisch signifikant.

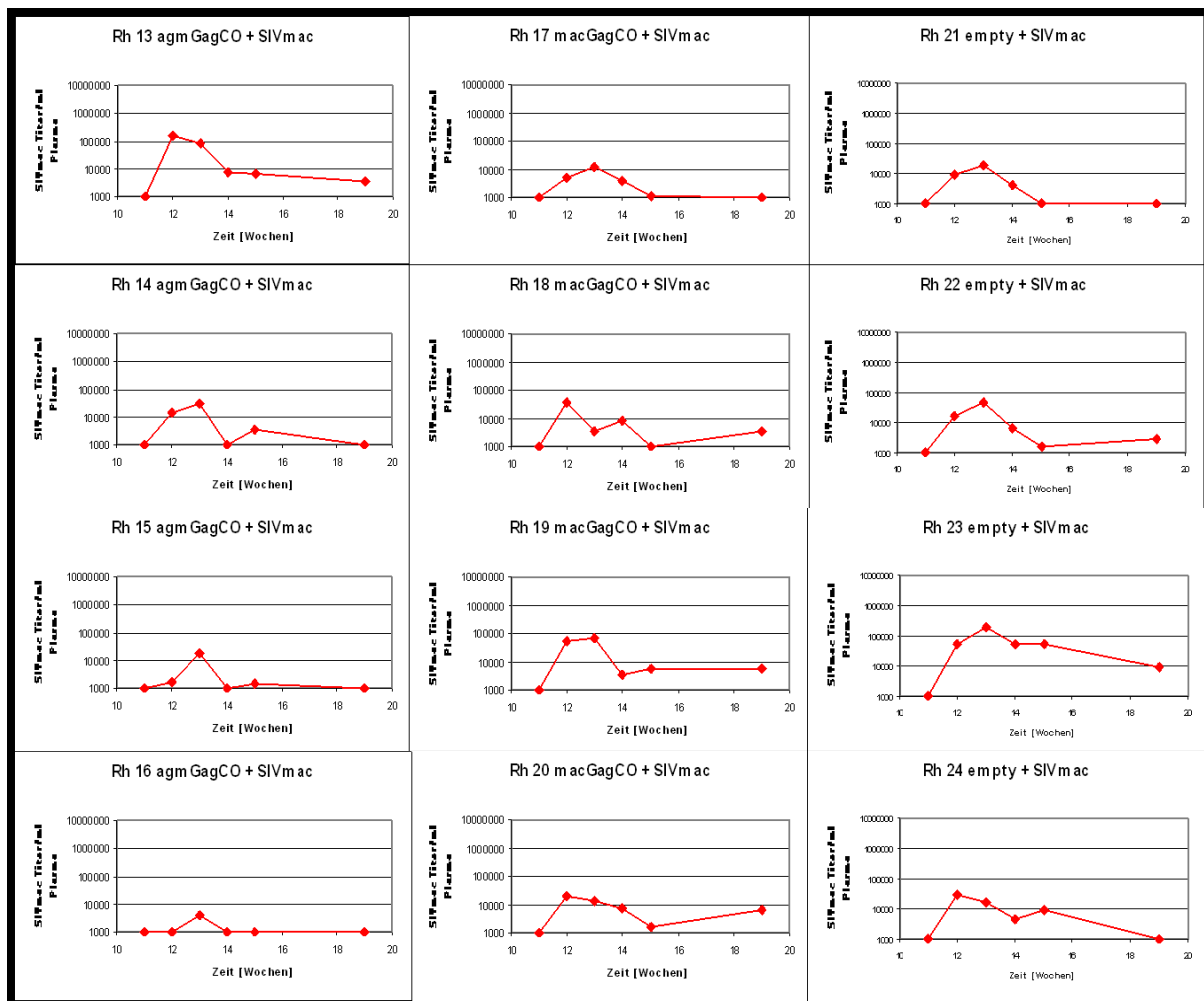


Abb. 45: Darstellung der Plasmaviruslast aller Rhesusmakaken im Verlauf der Studie ab dem Tag der SIVmac Infektion [SIVmac Virus/ml Plasma] bis 13 Wochen nach Infektion

Beide Primatenspezies sind infiziert und weisen einen vergleichbaren Virustiter auf.

3.3.9 Proviruslast im Verlauf der Studie

Die einzelnen Verläufe der Proviruslast in den AGM divergierten zueinander sehr stark und zeigten bezüglich der verwendeten Immunisierungs-DNA keinerlei Korrelationen (Abb. 46). Der Proviruspeak lag zwischen 8×10^3 und 2×10^5 meist ein bis zwei Wochen nach Infektion. AGM 7 und 9 stechen aus dem durchschnittlichen Mittel ein wenig heraus, hier lag der Proviruspeak bei 3 bzw. 6×10^5 Kopien/ 10^6 PBMC. Die Werte wirken sehr hoch, wurden aber durch Wiederholung bestätigt. Letztendlich ist die absolute Kopienzahl nicht so relevant, sondern vielmehr der Vergleich und das Verhältnis der Tiere zueinander. Die Anzahl integrierter SIVagm-Virusgenome pendelte sich nach einem Absinken der Proviruslast auf einem Plateau zwischen 5×10^3 und 5×10^4 / 10^6 PBMC ein. Alle Tiere wiesen vor Infektion kein ins Genom integriertes SIVagm auf.

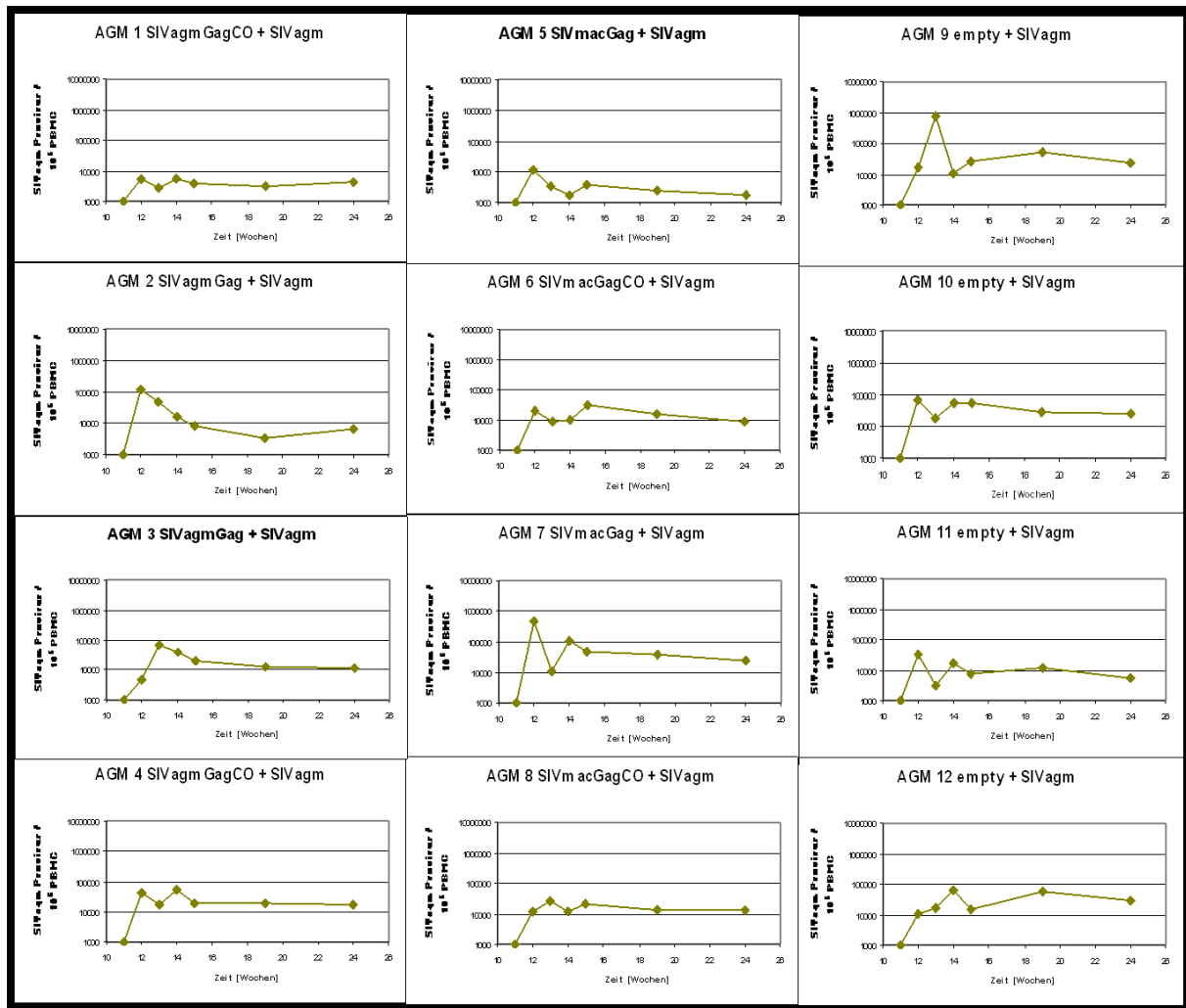


Abb. 46: Darstellung der Proviruslast aller AGM im Verlauf der Studie ab dem Tag der SIVagm Infektion [SIVagm Provirus/ 10^6 PBMC] bis 13 Wochen nach Infektion

Auch die Proviruslast in den Zellen der Rhesusmakaken verhielt sich wie erwartet (Abb. 47). Nach einem starken Anstieg der Proviruslast eine Woche nach Infektion war der Peak der Virusbelastung meistens bei 2 Wochen nach Infektion, woraufhin ein Absinken auf ein individuelles Niveau (Setpoint) zwischen 10^3 und 10^5 Proviruskopien/ 10^6 PBMC erfolgte. Alle Tiere wiesen vor Infektion kein ins Genom integriertes SIVmac auf.

Der Proviruspeak lag in der Immunisierungsgruppe, die SIVagmGagCO erhielt, zwischen $2,2$ und $9,9 \times 10^4$ Proviruskopien/ 10^6 PBMC, abgesehen von Rh 14, der den Proviruspeak bei 1×10^6 Proviruskopien/ 10^6 PBMC aufwies. Auch dieser Wert wirkt sehr hoch, wurde aber durch Wiederholung bestätigt und betrifft nur den Wert eines Rhesusaffen. Dieser Rhesusaffe war zwar bezüglich der anderen Proviruspeaks der Tiere dieser Gruppe auffällig höher, aber dennoch in dem möglichen Bereich einer SIVmac Infektion bei Rhesusmakaken.

In der SIVmacGagCo immunisierten Makakengruppe lag der Proviruspeak zwischen $3,7 \times 10^4$ und 4×10^5 Proviruskopien/ 10^6 PBMC, in der Leervektorkontrollgruppe bei $1,1$ - $2,5 \times 10^4$ Proviruskopien/ 10^6 PBMC. Dies entsprach den Erwartungen und ist zwischen den einzelnen Gruppen nicht statistisch signifikant.

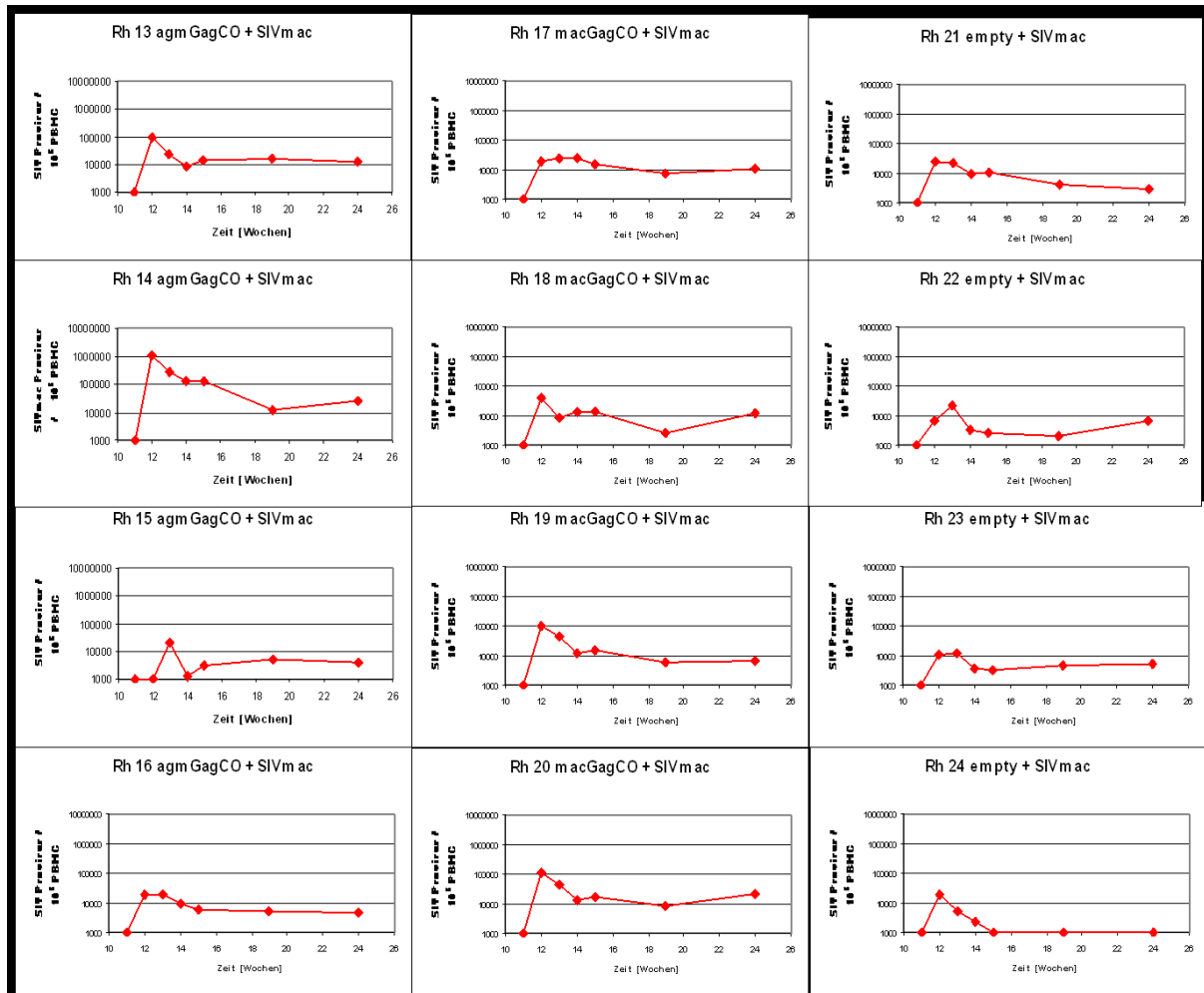


Abb. 47: Darstellung der Proviruslast aller Rhesusmakaken im Verlauf der Studie ab dem Tag der SIVmac Infektion [SIVmac Provirus/ 10^6 PBMC] bis 13 Wochen nach Infektion

Beide Primatenspezies verhielten sich bezüglich der Proviruslast, wie auch schon bei der Plasma-viruslast, sehr ähnlich und wiesen Titer auf gleichem Niveau auf.

3.3.10 Genotypisierung des Rh 15 mittels PCR

Eine exemplarische Genotypisierung des Rh 15 mit spezifischen Primern für die einzelnen Gene der MHC-I-Moleküle [98, 99] hat ergeben, dass dieser Rhesusaffe Mamu*A01, -*A02-05, -*B01 und -*B30 positiv ist (Abb. 48). Somit konnte das Resultat der MHC-I-Epitopkartierung mittels überlappender Peptide bestätigt werden.

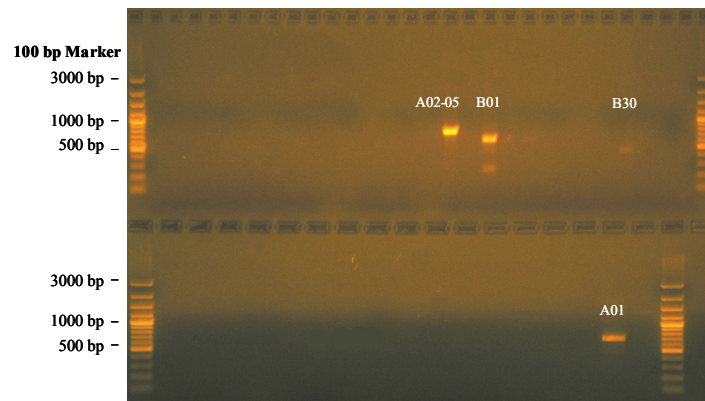


Abb. 48: Gelbild der Genotypisierungs-PCR für Rh 15Mamu*A02-05 (750 bp), -*B01 (600 bp), -*B30 (500 bp) Mamu*A01 (700 bp)

3.3.11 Physische Reaktionen der Tiere auf die durchgeführte Studie

Während der Immunisierungen zeigten die Primaten Blutergüsse an den Immunisierungsstellen, die nach einigen Tagen verschorften und abheilten. Nach Aussage der Tierärzte vor Ort hatten die Primaten keinerlei Beeinträchtigungen oder Schmerzen durch diese entstandenen Male. Nach Infektion zeigten die Rhesusmakaken grippeähnliche Symptome, die bei Infektion mit Immundefizienzviren im nicht-natürlichen Wirt auftreten und nach ein bis zwei Wochen wieder abklingen. Die AGM zeigten keine Reaktionen auf die Infektion mit SIVagm. Krankheitssymptome, die auf simianes AIDS hindeuten, wurden weder bei den AGM noch den Rhesusmakaken bis fünf Monate nach Infektion beobachtet. Normalerweise sollten die Rhesusmakaken frühestens ab dem sechsten Monat nach Infektion simiane AIDS-Symptome aufweisen, die AGM hingegen symptomfrei bleiben.

3.3.12 Maus- und Primaten-Studien im Überblick

Die codonoptimierten Konstrukte pTH-SIVagmGagCO und pTH-SIVmacGagCO wurden in Balb/c- und C57Bl/6-Mäusen auf ihre Funktionalität sowie Immunogenität überprüft. Die Konstrukte waren in Kombination mit der Gene Gun Applikation in der Lage, in beiden Mausspezies eine humorale und zelluläre Immunantwort zu induzieren. Daraufhin erfolgte eine Lokalisierung und Feinkartierung der CTL-Epitope für den Haplotyp H-2^b und H-2^d.

Auch in den Primaten war durch DNA Immunisierung eine humorale sowie zelluläre Immunantwort gegen Gag induzierbar. Eine zelluläre anamnestiche Immunantwort in den AGM war im Gegensatz zu den anderen Immunisierungsgruppen der Rhesusmakaken nicht zu beobachten. Die AGM, die mit SIVmacGag-DNA immunisiert waren, zeigten zumindest eine schwache transiente

anamnestische humorale Immunantwort. Die Immunisierungsgruppen der Rhesusmakaken wiesen dahingegen eine humorale anamnestische Immunreaktion auf. Während die Anti-Gag-AK-Titer in den AGM wieder auf das Basislevel vor Immunisierung sanken, stellten diese sich bei den Rhesusmakaken auf ein individuelles Niveau ein und blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten. CTL-Epitope konnten in beiden Primatenspezies lokalisiert und feinkartiert werden. Die Gag-spezifischen T-Zellreaktion in den AGM sank auf ein niedriges individuelles Level ab, die der Rhesusmakaken auf ein höheres individuelles Niveau.

4 Diskussion

Die Afrikanischen Grünen Meerkatzen (*Chlorocebus aethiops*) gehören zu einer Gruppe von mittlerweile über 30 verschiedenen Affenspezies, die während ihres gesamten adulten Lebens natürlich mit dem simianen Immundefizienzvirus (SIV) infiziert sind. Sie entwickeln im Gegensatz zum nicht-natürlichen Wirt keinerlei Krankheitssymptome [35, 36, 44]. Phylogenetisch dem humanen Immundefizienzvirus-1 (HIV-1) zuzuordnen, stellt das Virus im nicht-natürlichen Wirt Mensch eine der Geißeln moderner Zivilisation dar. Seit der Entdeckung von HIV-1 [2] und -2 [24] Anfang der 80iger Jahre blieben Versuche, einen Impfstoff zu entwickeln, ohne Erfolg. Die Entwicklung von antiretroviralen Therapien führte zur Verlängerung der Lebensspanne HIV-Infizierter Menschen, dennoch sterben jährlich weltweit 2,5 Millionen Menschen an den Folgen eines erschöpften Immunsystems. Das verminderte Eingreifen des Immunsystems in den natürlichen Wirten könnte eine Ursache für die Abwesenheit jeglicher Krankheitssymptome in diesen Tieren sein. Eine Apathogenität des Virus per se kann ausgeschlossen werden, da beispielsweise SIVagm in einem nicht-natürlichen Wirt (*Macaca nemestrina*) pathogen ist und ebenso Krankheitssymptome auslöst, wie sie im Menschen beobachtet werden [168].

Der natürliche Wirt AGM reagiert auf eine natürliche oder experimentelle SIVagm-Infektion weder mit einem Überschießen der Immunantwort gegen das Virus [169], einem CD4⁺-T-Zell-Abfall noch krankhaften Veränderung der Lymphknoten durch Bindung von SIVagm-Partikeln [36, 106, 170, 171], den sonst typischen Merkmalen einer HIV-Infektion im Menschen [58, 172, 173, 174, 175] oder SIVmac-Infektion in Rhesusmakaken [176, 177]. Die fehlende Immunreaktion gegen das Kernprotein Gag im natürlichen Wirtssystem [105, 106] ist ein Teilaspekt und sollte in der vorliegenden Primatenstudie näher untersucht werden. Die Hypothese war, dass das Immunsystem der AGM anders auf das gereinigte injizierte exogene Virusprotein Gag reagiert als auf das von den AGM endogen gebildete Gag Protein, welches durch DNA-Immunisierung vorab gegeben werden sollte. Die Immunisierung mit *gag* DNA sollte ein Priming der Immunantwort vor Infektion mit SIVagm und eine anamnestiche Immunantwort bei Infektion bewirken. Es wurden SIVagm- und SIVmacGag-DNA für den Codon-Gebrauch der Säugetiere optimiert. Diese wurden anschließend zur Immunisierung von AGM als Vertreter des natürlichen Virus-Wirtsystems und Rhesusmakaken (*Macaca mulatta*) als Vertreter der nicht-natürlichen Virus-Wirt-Beziehung zu verwenden.

Nach eingehender Überprüfung der Expression *in vitro* wurden mehrere Studien in Balb/c- und C57Bl/6-Mäusen durchgeführt. Durch die nachgewiesene Funktionalität und vergleichende Studien zu Wildtyp-Sequenzen sowie durch Kombination mit dem Adjuvanz *gmcsf*

in vivo konnte die DNA-Immunisierung in den Primaten erfolgen. Dabei wurden jeweils drei Gruppen gebildet: die Gruppe eins erhielt SIVagmGagCO-DNA, die Gruppe zwei erhielt SIVmacGagCO-DNA und die Gruppe drei einen Kontroll-Leervektor. Um eine höchstmögliche Immunantwort zu erzielen, wurde eine Koapplikation von speziesspezifischer *gmcsf* DNA durchgeführt. Das Gen *gmcsf* sollte als Adjuvanz wirken, da bei Tierversuchen in Mäusen eine immunsteigernde Wirkung beobachtet wurde [145, 178] (eigene Versuche (Daten nicht gezeigt)).

4.1 DNA-Immunisierung im Maus-Modell

Die Codonoptimierung von Genen ist eine effiziente Methode, die Proteinexpression in Zellkultur und die Immunantwort im lebenden Organismus zu steigern. Im Maus-Modell konnte durch DNA-Immunisierung mit dem codonoptimierten Gen ein erheblich größerer Anteil an Gag-spezifischen T-Zellen und Antikörpern induziert werden als mit der Wildtyp-Variante. Die Kostimulation mit murinem *gmcsf* war im Bezug auf das *gag* Gen nötig, da durch GMCSF Monozyten zu Dendritischen Zellen (DC) maturieren, die Prägung von T-Helferzellen durch Anwendung von Makrophagen und DCs optimiert wird sowie eine Steigerung der spezifischen CTL- und Antikörper-Immunantwort erfolgt [179]. Dendritische Zellen sind professionell Antigenpräsentierende Zellen (APC), die unreife T-Zellen in den Lymphknoten prägen können und somit die Reifung dieser Zellen bewirken, die Immunisierung läuft effektiver ab. Die Verwendung von codonoptimierten DNA-Sequenzen führt zu einer neuen Qualität in der Immunmodulation und Impfstoffentwicklung. Dadurch ist wesentlich weniger Immunisierungs-agenz nötig. Wie hier demonstriert, reicht schon eine einmalige Immunisierung mit 0,014 µg codonoptimierter DNA pro Maus aus, um eine deutliche humorale und zelluläre Immunantwort auszulösen.

Der Immunisierungserfolg mit codonoptimierten Genen war wesentlich größer als mit Wildtypgenen. Dennoch gab es, wie erwartet, innerhalb beider Gruppen starke Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen bezüglich der Immunantwort. Dies könnte auf eine voneinander abweichende Kondition des Immunsystems (unterschiedlicher Inflammationszustand durch Infektionen mit *Helicobacter pylori* oder *Pasteurella ssp.*) jeder einzelnen, wenn auch syngeneten Maus oder auf Unterschiede in der Beladung mit Gold-DNA-Agglomerat der einzelnen Kartuschen und deren Applikation zurückzuführen sein. Des Weiteren haben Differenzen in der Nahrungsaufnahme zwischen den Mäusen und ganz besonders das Potential, stärker oder vermindert auf Stress zu reagieren, einen Einfluss auf das Immunsystem und somit auf dessen Reaktion Immunisierungs-agenzien gegenüber.

Durch die Immunisierung von Balb/c und C57Bl/6 mit SIVagm-, SIVmac- und HIV-1Gag war es möglich zu versuchen, MHC-I-Epitope zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Milzzellen

jener immunisierten Mäuse wurden isoliert und im ELISpot-Assay eingesetzt. Ein Peptid muss einige Voraussetzungen erfüllen, um in die Tasche eines MHC-I-Moleküls zu passen. Das Peptid sollte zwischen 8 und 11 Aminosäuren lang sein und in den Ankeraminosäuren apolar sein, zumindest sind apolare Aminosäuren überdurchschnittlich häufig an Position der Ankeraminosäure vertreten (Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin und Valin). Erfüllt die Aminosäuresequenz des Gens diese Voraussetzungen nicht, kann kein Peptid dieser Sequenz binden und somit keine Prägung von T-Zellen erfolgen.

Die Stimulation der Milzzellen mit SIVGag Peptidpools im Matrixformat ermöglichte, 15mer Peptide durch geringstmöglichen Verbrauch an Zellen eindeutig zu identifizieren. In der anschließenden Feinkartierung konnten 9-10mere identifiziert werden, die für die jeweiligen MHC-Typen charakteristisch sind und bei jeder Immunisierung der Mäuse mit SIVGag (DNA- oder Proteinebene) des gleichen SIV-Stammes induziert werden. So konnte zum Beispiel das Nonamer AMQMLKDTI von HIV-1 kartiert werden, welches schon in der Literatur beschrieben für den MHC-Typ der Balb/c Maus (H-2^d) charakteristisch ist [180]. In der Syfpeithi-Vorhersage erhielt das Peptid als mögliches Epitop den 36. Platz mit einem Score von 14. Die MHC-I-Bindungsvorhersage von Immune Epitope Database (IEDB Analysis Resource; http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_binding.html) zeigte dieses Epitop an siebter Stelle. Eine weitere MHC-I-Epitop-Vorhersage Datenbank (Hanah Margalit's Homepage (HMH); <http://margalit.huji.ac.il/>) gibt dieses Peptid als mögliches Epitop an Stelle 47 an. Diese Ergebnisse zeigen die Vielfalt und Differenzen der einzelnen Epitop-Vorhersagen und stellen die Aussagekraft der Datenbanken in Frage, somit kann die virtuelle Vorhersage zwar ein Hinweis sein, muss aber nicht zutreffen.

Die weitere Identifizierung von Epitopen induziert durch SIVagm- bzw. SIVmacGag konnte durch diese Methode erfolgen. Die im ELISpot-Assay identifizierten gleichwertigen Nonamere AIYRRWIL und YRRWILGL für SIVagmGag in Balb/c Mäusen binden an das MHC-I-Molekül von Mäusen des Haplotyps H-2^d. Die Syfpeithi-Epitop-Vorhersage gibt die Existenz dieses Peptids an der 53. Stelle (Score 13) an, was die Aussagefähigkeit der Epitopvorhersage stark einschränkt. Die Epitop-Vorhersage von MHM gibt für das Nonamer YRRWILGL die höchste Wahrscheinlichkeit an und für das andere Nonamer AIYRRWIL Platz 12. Hier scheint der Algorithmus der Datenbank mit der Realität überein zu stimmen. Beide Nonamere stimulieren spezifische T-Zellen untereinander gleich stark, jedoch weitaus geringer als das identifizierte 15mer VGAIYRRWILGLQK es vermag. In dem Fall wird vermutet, dass durch das 15mer auch CD4⁺-T-Helferzellen stimuliert werden und INF γ produzieren, was die Ergebnisse im ELISpot-Assay erklären würde. Dies könnte in einem neuen ELISpot-Assay durch CD4⁺-T-Zell-Depletion

mittels MACS (Magnetic Assisted Cell Sorting) untersucht werden. Allerdings wäre dazu eine neue Immunisierung von Mäusen erforderlich gewesen, da die Mausmilzzellen aufgebraucht sind.

Das Epitop DRFYKAIRAEQASGE für SIVagmGag in C57Bl/6 Mäusen konnte identifiziert, aber nicht feinkartiert werden. Dieses Epitop weist starke Homologie zum subdominanten Epitop VDRFYKTLRAEQASQ für HIV-1_{CladeB} in Balb/c Mäusen [181] auf und deutet daraufhin, dass der Sequenzunterschied zwischen HIV-1_{CladeB} und SIVagm3 in manchen Bereichen sehr gering und der Unterschied bezüglich des Epitops zwischen den Haplotypen H-2^d und H-2^b durchaus von nur wenigen Aminosäuren abhängig ist. Das 15mer Epitop für SIVagmGag in C57Bl/6 Mäusen ist nur in dieser Länge in der Lage, Mausmilzzellen zu stimulieren und eine INF γ Ausschüttung zu bewirken. In dieser Peptidlänge kann eine Stimulation von CD4⁺-T-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Die Epitop-Vorhersagen von Syfpeithi, MHM und IEDB geben für diese Sequenz kein mögliches Epitop an.

Nicht nur Nonamere können an H-2^b MHC-I-Moleküle binden, sondern auch Dekamere, was durch die Identifizierung des 10mers AVKNWMTQTL für SIVmacGag in C57Bl/6 Mäusen bewiesen wurde. Die in diesem Dekamer enthaltenen Nonamere binden entweder gar nicht oder nur sehr schlecht, was darauf hin deutet, dass die Ankeramino-säure an einem der beiden oder beiden Enden zu finden ist. Laut Syfpeithi-Vorhersage liegen die Ankeramino-säuren an Position 5 und 9. Allerdings wurde das Dekamer erst an 52. Stelle (Score 13) als mögliches Epitop angegeben.

Mit dieser Methode war es weder möglich, ein MHC-I-Epitop für SIVmacGag in Balb/c Mäusen zu identifizieren, wie auch in zur Megede et al., (submitted) beschrieben, noch das Epitop SQVTNPANI für HIV-1-Gag in C57Bl/6 Mäusen [182] bzw. SQVTNSATI für HIV-1_{HXB2}-Gag (Los Alamos Immunologie Datenbank) wieder zu finden. Hier scheint eine Sequenzvarianz von einem HIV-1_{CladeA/G} Stamm zu einem Stamm von HIV-1_{CladeB} auszureichen, so dass keine Bindung zwischen dem MHC-I-Molekül und dem Peptid mehr erfolgen kann.

4.2 DNA-Immunisierung im Primaten-Modell

Untersuchungen zur Pathogenese von Infektionen mit Immundefizienzviren können aufgrund eines fehlenden Kleintiermodells nur in Primaten durchgeführt werden, was einen größeren technischen Aufwand, Limitierungen in der Versuchsplanung und -durchführung zur Folge hat und ethische Probleme aufwirft. Deshalb wurden mögliche Vorversuche in Mäusen durchgeführt und die primatenspezifischen Fragestellungen mit Hilfe von Literaturrecherchen weitestgehend beantwortet. Die bioballistische Applikation von DNA ist eine relativ neue Methode und wurde bisher hauptsächlich bei Kleintieren verwendet, weshalb es Richtwerte bezüglich der Gesamt-DNA-

Menge, Höchstmenge an DNA pro Goldmenge bzw. Schuss, Anzahl der Schüsse pro Immunisierung, Anzahl der Immunisierungen sowie Angaben zum zeitlichen Abstand der Immunisierungen nicht gab. Die Spannbreite innerhalb der Parameter für eine DNA-Immunisierung von Primaten war zwischen den einzelnen Quellen sehr groß. Angegeben waren 4-8 Schuss/Immunisierung, wobei pro Schuss 0,25-4 µg DNA verabreicht wurden, mit einer Gesamtmenge an applizierter DNA von 1-32 µg/Immunisierung und insgesamt 1-4 Immunisierungen pro Tier mit einem Abstand von 2-16 Wochen [158, 159, 160, 161, 162, 163]. Falls der Versuch zu keiner erfolgreichen Immunisierung führt, sollte wenigstens ausgeschlossen werden, dass zu wenig DNA eingesetzt wurde, weshalb die Wahl auf 32 µg DNA/Immunisierung fiel. Die maximale Immobilisierung von DNA auf die Goldpartikel in dem für einen Schuss verwendeten Schlauchstück (0,5 µg Gold) betrug nach eigenen Versuchen 4 µg (Daten nicht gezeigt, bestätigt durch Sakai and Hime-no, [183]). Aufgrund der Beobachtungen in Mäusen konnte durch die gleichzeitige Gabe von *gmc sf* DNA eine deutliche Steigerung der Immunantwort erzielt werden. Ob sich das in Primaten ebenso verhält, wurde noch nicht bestätigt, aber auch nicht widerlegt. Insofern sollte die *gag* DNA zusammen mit *gmc sf* DNA im gleichen Mengenverhältnis appliziert werden, was auf 64 µg/Immunisierung verabreicht durch 16 Schuss hinauslief. Aufgrund von Literaturrecherchen und einer benötigten möglichst großen Fläche wurde als Applikationsstelle die rasierte Haut auf dem Bauch der Tiere gewählt. Der Zeitraum zwischen den einzelnen abdominalen DNA-Gaben resultierte aus einer Balance zwischen Zeit und Effektivität und erfolgte alle 3 Wochen. Es sollten 3 Immunisierungen erfolgen, aber mit der Option eine 4. Immunisierung noch durchführen zu können, wenn die vor der dritten DNA-Gabe gemessene Immunantwort noch eine Steigerung zuließ.

Um möglichst viele Ergebnisse bei möglichst geringer Anzahl an verwendeten Versuchstieren zu erzielen, wurden 6 Gruppen à 4 Tiere gebildet, die innerhalb einer Gruppe gerade noch eine statistische Aussage zuließen.

Bisher war es nicht möglich in Afrikanischen Grünen Meerkatzen Gag-spezifische T-Zellen zu detektieren, weder nach Immunisierungen mit Gag-Protein [105] noch bei Primaten, die natürlich oder experimentell langjährig mit SIVagm infiziert sind (Abschnitt 3.3.4 Abb. 33, persönliche Mitteilung Dr. S. Norley). Deshalb war vor Beginn der Versuche nicht klar, ob das durch die geplante Strategie mittels ELISpot-Assay möglich sein wird. Aus diesem Grund wurde jeweils ein Affe jeder Gruppe zusätzlich mit 32 µg *ova* DNA (koimmobilisiert mit 32 µg *gmc sf* DNA) immunisiert, um bei erfolgloser Gag-Immunisierung OVA-spezifische T-Zellen zu detektieren und die Immunisierungsstrategie an sich zu bestätigen.

Schon nach der ersten DNA-Gabe waren bei einigen AGM (AGM 2, 4 und 8) und Rhesusmakaken (Rh 14 und 18) Gag-spezifische T-Zellen detektierbar. Im weiteren Verlauf der Immunisie-

rungen konnten bei allen Tieren, unterschiedlich stark ausgeprägt, Gag-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Auch die 4. Immunisierung resultierte bei einigen Tieren in einer Immunsteigerung bzw. Induktion einer Reaktion gegen Gag. Die anfangs generelle Immunreaktion auf alle Peptidpools änderte sich im Verlauf der Studie zu Reaktionen, die sich gegen einige signifikante Peptidpools und damit gegen bestimmte 15mer-Peptide richtete.

Merkwürdigerweise konnte keine spezifische zelluläre Immunreaktion gegen OVA in den Tieren induziert werden, die zusätzlich noch die gleiche Menge an *ova* DNA erhielten. Allerdings kam es in diesen AGM (AGM 4 und 8) zur massiven Steigerung der spezifischen Zellreaktion gegen das eigentliche Immunisierungsganz. Auch der AGM 12 reagierte nach Infektion wesentlich stärker als die anderen Primaten in der Leervektorkontrollgruppe. Eine Adjuvanzwirkung von OVA ist bisher nicht beschrieben worden und kann bis jetzt auch nicht erklärt werden. Um eine konkrete Aussage darüber treffen zu können, welchen Einfluss die zusätzliche Gabe von *ova* DNA hat, müssten Versuche mit wesentlich mehr Versuchstieren durchgeführt werden. Bei den Rhesusaffen konnten diese Beobachtungen nicht erfolgen.

Obwohl es fraglich ist, könnte eine Erklärung für die Steigerung der zellulären Immunantwort auch die doppelte Menge an *gmcsf* sein, da bekanntlich GMCSF im Organismus eine bessere Prägung der T-Zellen zur Folge hat. Zwar erhielten auch drei der Rhesusmakaken zusätzlich *gmcsf*, aber nicht das Gleiche wie die AGM, sondern speziesspezifische *gmcsf* DNA. Aufgrund fehlender Funktionsanalysen vom gebildeten agm- bzw. rh-GMCSF kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die zusätzliche Gabe einen Einfluss auf den Immunisierungserfolg hatte oder es zwischen den beiden speziesspezifischen Genen Funktionalitätsunterschiede gab. Generell ist es relativ unwahrscheinlich, dass durch die Verdopplung der DNA-Menge ein Schwellenwert überschritten wird, der die Immunantwort so extrem erhöhen würde.

Der Zufall, dass genau die drei AGM eine erhöhte Immunsteigerung aufweisen, die zusätzlich *ova* und *gmcsf* bekommen haben, ist relativ unwahrscheinlich (1:64). Auch wenn ohne neuen Versuch die Wirkung von einem der beiden oder beiden Genen nicht gänzlich geklärt werden kann, scheint diese Wirkung nur die T-Zellen zu betreffen, denn in den Antikörpertitern weichen diese Tiere nicht von den anderen ab. Durch die zusätzliche Gabe von *ova* wäre es auch denkbar, dass OVA-spezifische T-Helfer-Zellen angeregt und dadurch vermehrt Gag-spezifische T-Zellen induziert wurden.

Die Antikörpertiter gegen OVA korrelieren in keiner Weise mit dem Versuchsaufbau, wenn auch in einigen Primaten (betrifft mehr Rhesusmakaken als AGM, unabhängig von zusätzlicher Immunisierung mit *ova*) ein Antikörperpeak am Tag der Belastung entstand und dies auf ein bestimmtes Ereignis zurück zu führen sein muss. Einige Tiere besitzen schon vor Beginn der Versuche Anti-

körper gegen OVA, andere wiederum weisen selbst nach Immunisierung mit *ova* keine auf. Anscheinend erfolgt die Bildung von OVA-Antikörpern über die Diät der Tiere, wie schon in Totenkopffaffen [165] und dem Menschen [166] gezeigt. Die fehlende Korrelation von OVA-Antikörpern zum Versuchsaufbau sowie das Fehlen von OVA-spezifischen T-Zellen führen zu dem Schluss, dass OVA als Kontrollantigen weder für die humorale noch für die zelluläre Immunantwort in Primatenversuchen eingesetzt werden sollte.

Erstmals ist es gelungen Gag-spezifische T-Zellen in den AGM nachzuweisen und zu untersuchen. Mit überlappenden Peptiden war es möglich, zunächst 15mer, später 9-10mer Epitope zu kartieren. Eine Zuordnung zum Haplotyp der einzelnen Meerkatzen war bisher nicht möglich, da nur einige wenige Haplotypen dieser Primatenspezies bekannt sind und dies für diese Studie nicht relevant ist. Diese Zuordnung ist für weitere Studien in den Tieren als SIV-Tiermodell enorm wichtig, weshalb Analysen bezüglich des Repertoires an Haplotypen der Meerkatzen durchaus sinnvoll wären. Durch Umschreibung von RNA stimulierter PBMC in cDNA, anschließender Amplifikation der MHC-I-Gene und Klonierung der einzelnen entstandenen Fragmente sowie Sequenzierung dieser [99], wäre es möglich, die Haplotypen jedes einzelnen AGM zu ermitteln. Danach könnte eine Zuordnung der ermittelten Epitope zum Haplotyp erfolgen.

Die in den Rhesusmakaken identifizierten 9 bzw. 10mer Epitope sollten entsprechenden Haplotypen zugeordnet werden. Im Rhesussystem sind schon viele MHC-I-Haplotypen bekannt, für die bereits sequenzspezifische Primer veröffentlicht wurden [56, 98, 99]. Anhand von Mamu*A und *B der Rhesusmakaken und den ermittelten Epitopen müsste eine Zuordnung des Epitops zu einem bestimmten Haplotyp möglich sein, was in dieser Arbeit nur exemplarisch für den Rh 15 durchgeführt wurde. Dieser Rhesusmakake wurde ausgewählt, um die Identifizierung des Peptids CTPYDINQM durch den ELISpot-Assay zu bestätigen. Dieses Peptid konnte für Rh 13 und 15 identifiziert werden und ist in der Literatur als MHC-I-Epitop für Mamu*A01 beschrieben [184]. Da der Haplotyp nur für den Rhesusaffen 15 (Mamu*A01, -*A02-05, -*B01 und -*B30) ermittelt wurde, konnten Korrelationen von Epitop und MHC-Typ für weitere identifizierte Peptide nicht erfolgen.

Die T-Zellen der Primaten reagierten zu Beginn des Immunisierungsversuchs relativ breit auf alle Gag-Peptidpools, bis sich nach Infektion die immunodominanten T-Zellen durchsetzten. Dadurch war es möglich, MHC-I-Epitope zu kartieren, diese Peptide sind 9-10 Aminosäuren lang.

Das wichtigste Indiz, wie ein Organismus auf ein eindringendes Virus reagiert, ist die An- oder Abwesenheit einer anamnестischen Immunantwort auf humoraler sowie zellulärer Ebene. Diese wird kurz nach Infektion beobachtet und gibt Auskunft darüber, ob vorangegangene Immunisierungen den Organismus auf das Virus vorbereiten konnten. Ein schneller Anstieg von Antikörpern

sowie T-Zellen ein bis drei Wochen nach Infektion deuten auf einen „Priming“-Erfolg durch die Immunisierung hin und entsprechen einer anamnestischen Immunantwort.

Im Gegensatz zu den Rhesusaffen konnte in den Afrikanischen Grünen Meerkatzen durch DNA-Immunisierung keine zelluläre und nur eine schwache transiente humorale anamnestische Immunantwort nach Infektion induziert werden und dies auch nur in der 2. Immunisierungsgruppe, deren Tiere SIVmacGagCO erhielten. Die AGM, die SIVagmGagCO DNA erhielten, reagierten auf das endogen gebildete Gag-Protein der Immunisierung anders als auf die Infektion mit SIVagm und bildeten vermutlich deshalb keine anamnestische Immunantwort aus. Zumindest auf humoraler Ebene sind AGM in der Lage, ein „Priming“ zu erfahren und mit gesteigerter Immunreaktion auf eine Virusinfektion zu reagieren, wie es in Gruppe 2 erfolgte. Durch SIVmacGagCO DNA war es möglich, die AGM auf eine SIVagm-Infektion vorzubereiten, wenn auch der induzierte Antikörpertiter acht Wochen nach Infektion nicht mehr nachweisbar war. Ebenso war es möglich, Rhesusmakaken mit SIVagmGagCO bzw. SIVmacGagCO DNA zu „primen“ und so auf die SIVmac-Infektion vorzubereiten. Durch Verwendung einer DNA-Sequenz, die der Sequenz des Infektionvirus entsprach, schlug das „Priming“ in den AGM fehl. Weder ist die Pro- bzw. Plasmaviruslast noch die Immunisierungsstrategie an sich für dieses von den Rhesusmakaken abweichende Phänomen verantwortlich.

Im Gegensatz zur anfänglichen Hypothese differenziert das Immunsystem der Afrikanischen Grünen Meerkatzen nicht zwischen dem gereinigten SIVagmGag-Protein der Immunisierung früherer Studien und dem viralen Gag-Protein der SIVagm-Infektion, da durch die Immunisierung mit *gag* DNA und demzufolge endogen gebildetem Gag-Protein auch keine anamnestische Immunantwort induziert werden konnte. Daher kann die fehlende anamnestische Immunantwort der AGM nach Immunisierung mit Gag-Protein vermutlich nicht auf Unterschiede in der Proteinprozessierung und -erkennung (endogen versus exogen) zurückgeführt werden. Durch eine gleichwertige DNA-Immunisierung der Rhesusmakaken mit anschließender SIVmac-Infektion zeigte sich eine anamnestische Immunantwort auf humoraler und zellulärer Ebene und bewies die Möglichkeit, mit dieser Immunisierungsstrategie ein Priming der Versuchstiere zu erreichen. Die Arbeitshypothese, dass die AGM zwischen exogen und endogen gebildetem Gag-Protein unterscheiden, konnte somit widerlegt werden. Die Ursache für die fehlende Gag-Immunantwort im natürlichen Wirtssystem bleibt weiterhin unklar. Die Ergebnisse dieser Studie deuten eher an, dass während der Infektion dieses natürlichen Wirtes eine aktive Unterdrückung der anti-Gag-Antikörper Antwort stattfindet, möglicher Weise induziert durch eine Anergie in Gag-spezifischen T-Helferzellen.

Dennoch könnte man vermuten, dass die AGM aufgrund einer kurzzeitigen Induktion von SIVagmGag-spezifischen Antikörpern und T-Zellen in ihrem Genom SIVagmGag-ähnliche Sequen-

zen tragen, die jegliche Gag-spezifische Immunantwort, basierend auf der Immunisierung, herunterreguliert.

Da im humanen Genom endogene Retroviren (HERVs) gefunden wurden [185, 186, 187, 188], kann man davon ausgehen, dass auch in den nichthumanen Primaten, wie AGM, Retroviren vor Jahrmillionen ins Genom integriert sind. Diese simianen ERVs könnten dafür verantwortlich sein, dass SIVagm bei Infektion nicht als fremd erkannt werden und deshalb keine Immunantwort erfolgt. Dies würde auch das Fehlen einer anamnестischen Immunantwort bei Infektion nach DNA-Immunisierungen mit SIVagmGag in den AGM erklären, aber nicht, weshalb kurzzeitig eine humorale sowie zelluläre Gag-spezifische Immunantwort induzierbar war.

Aufgrund der Pro- bzw. Plasmaviruslast der AGM, die zum einen äquivalent zu der in den Rhesusmakaken und zum anderen unabhängig vom Immunisierungsagenz war, könnte auf die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) durch SIVagm hindeuten. Diese Tregs könnten nur auf Gag-spezifische B- und T-Zellen einwirken und deren Aktionen gegen SIVagmGag einschränken oder unterbinden. Dies würde erklären, weshalb die Induktion von Gag-spezifischen Antikörpern sowie T-Zellen funktioniert, diese aber nur kurzzeitig nachweisbar sind. Das Vermögen Entzündungshemmer hoch und/oder deren Gegenspieler herunter zu regulieren, könnte nicht nur durch die Tregs erfolgen, sondern auch durch Sequenzen innerhalb des gag Gens.

Die Hyperaktivierung des Immunsystems des nicht-natürlichen Wirts wird als Kausalität für den pathogenen Verlauf der Infektion im Gegensatz zu natürlichen Wirten angesehen, die keine der für eine Infektion charakteristischen Reaktionen zeigen. Der Krankheitsverlauf im nicht-natürlichen Wirtssystem der Rhesusmakaken konnte weder durch Entfernung des Thymus [189] noch durch CD8⁺-T-Zell-Depletion [91] positiv beeinflusst werden. Der Thymus scheint keine oder nur eine kleine Rolle im Krankheitsverlauf zu spielen und ist hauptsächlich für die Regeneration des Immunsystems verantwortlich. Die CD8⁺-T-Zell-Depletion führte sogar zu einer schnelleren Progression.

Der Hintergrund für die reduzierte Gag-spezifische Immunantwort bleibt spekulativ, passt jedoch in die allgemeine These, dass die fehlende Hyperaktivierung des Immunsystems der AGM [190] für die Apathogenität im natürlichen Wirtssystem verantwortlich ist. Eine Immunantwort gegen ein Protein, welches früh und zahlreich gebildet wird, sollte relativ stark ausgeprägt sein, was in den AGM bezüglich Gag nicht der Fall ist. Im nicht-natürlichen Wirt Rhesusmakaken sind hingegen 20 % der CD8⁺-Zellen spezifisch für das Mamu*A01 Peptid CM9, welches in Gag lokalisiert ist [191]. Die reduzierte Gag-spezifische Immunantwort, die fehlende Hyperaktivierung des Immunsystems und das kurz nach Infektion auftretende anti-inflammatorische Zytokinprofil [192]

sorgen dafür, dass im natürlichen Wirt AGM die Infektion mit Immundefizienzviren AIDS-frei verläuft.

Literaturverzeichnis

- [1] Gottlieb, M. S.; Schroff, R.; Schanker, H. M.; Weisman, J. D.; Fan, P. T.; Wolf, R. A. und Saxon, A. (1981): Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency, 305, 24, 1425-1431, December 10, 1981, <http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/305/24/1425>
- [2] Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dautuet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W. und Montagnier, L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS), Science 220 [4599], Seite 868-871. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/220/4599/868>
- [3] Gallo, R. C.; Salahuddin, S. Z.; Popovic, M.; Shearer, G. M.; Kaplan, M.; Haynes, B. F.; Palker, T. J.; Redfield, R.; Oleske, J.; Safai, B. und et, al (1984): Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS, Science 224 [4648], Seite 500-503. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/224/4648/500>
- [4] Popovic, M.; Sarngadharan, M. G.; Read, E. und Gallo, R. C. (1984): Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS, Science 224 [4648], Seite 497-500. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/224/4648/497>
- [5] Sarngadharan, M. G.; DeVico, A. L.; Bruch, L.; Schupbach, J. und Gallo, R. C. (1984): HTLV-III: the etiologic agent of AIDS, Princess Takamatsu Symp 15, Seite 301-8.
- [6] Pope, M. und Haase, A. T. (2003): Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection, Nat Med 9 [7], Seite 847-52.
- [7] Dalgleish, A. G.; Beverley, P. C.; Clapham, P. R.; Crawford, D. H.; Greaves, M. F. und Weiss, R. A. (1984): The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, Nature 312 [5996], Seite 763-7.
- [8] Lang, W. (1989): Frailty selection and HIV, Lancet 1 [8651], Seite 1397.
- [9] Pantaleo, G.; Graziosi, C. und Fauci, A. S. (1993): The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection, AIDS 7 Suppl 1, Seite S19-23.
- [10] Schellekens, P. T.; Tersmette, M.; Roos, M. T.; Keet, R. P.; de Wolf, F.; Coutinho, R. A. und Miedema, F. (1992): Biphasic rate of CD4+ cell count decline during progression to AIDS correlates with HIV-1 phenotype, AIDS 6 [7], Seite 665-9.
- [11] Pomerantz, R. J. und Horn, D. L. (2003): Twenty years of therapy for HIV-1 infection, Nat Med 9 [7], Seite 867-73.
- [12] Gillet, J. Y.; Bongain, A.; Monpoux, F. und Mariani, R. (1995): [Maternal-fetal transmission of HIV], Arch Pediatr 2 [2], Seite 169-72.
- [13] Ghosn, J.; Pellegrin, I.; Goujard, C.; Deveau, C.; Viard, J. P.; Galimand, J.; Harzic, M.; Tamalet, C.; Meyer, L.; Rouzioux, C. und Chaix, M. L. (2006): HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time, AIDS 20 [2], Seite 159-70.
- [14] Valdiserri, R. O.; Ogden, L. L. und McCray, E. (2003): Accomplishments in HIV prevention science: implications for stemming the epidemic, Nat Med 9 [7], Seite 881-6.

- [15] Buchbinder, S. und Vittinghoff, E. (1999): HIV-infected long-term nonprogressors: epidemiology, mechanisms of delayed progression, and clinical and research implications, *Microbes Infect* 1 [13], Seite 1113-20.
- [16] Harrer, E.; Harrer, T.; Buchbinder, S.; Mann, D. L.; Feinberg, M.; Yilma, T.; Johnson, R. P. und Walker, B. D. (1994): HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte response in healthy, long-term nonprogressing seropositive persons, *AIDS Res Hum Retroviruses* 10 Suppl 2, Seite S77-8.
- [17] Paroli, M.; Propato, A.; Accapezzato, D.; Francavilla, V.; Schiaffella, E. und Barnaba, V. (2001): The immunology of HIV-infected long-term non-progressors - a current view *Immunol Lett* 79 [1-2], Seite 127-9
- [18] Vidal, F.; Peraire, J.; Domingo, P.; Broch, M.; Cairo, M.; Pedrol, E.; Montero, M.; Vilades, C.; Gutierrez, C.; Sambeat, M. A.; Fontanet, A.; Dalmau, D.; Deig, E.; Knobel, H.; Sirvent, J. J.; Richart, C.; Veloso, S.; Saumoy, M.; Lopez-Dupla, M.; Olona, M.; Cadafalch, J.; Fuster, M.; Ochoa, A.; Soler, A.; Guelar, A. und Gonzalez, J. (2006): Polymorphism of RANTES chemokine gene promoter is not associated with long-term non-progressive HIV-1 infection of more than 16 years, *J Acquir Immune Defic Syndr* 41 [1], Seite 17-22.
- [19] Rowland-Jones, S. L. und McMichael, A. (1995): Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus?, *Curr Opin Immunol* 7 [4], Seite 448-55.
- [20] Clerici, M.; Barassi, C.; Devito, C.; Pastori, C.; Piconi, S.; Trabattoni, D.; Longhi, R.; Hinkula, J.; Broliden, K. und Lopalco, L. (2002): Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41, *AIDS* 16 [13], Seite 1731-41.
- [21] Devito, C.; Hinkula, J.; Kaul, R.; Kimani, J.; Kiama, P.; Lopalco, L.; Barass, C.; Piconi, S.; Trabattoni, D.; Bwayo, J. J.; Plummer, F.; Clerici, M. und Broliden, K. (2002): Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects, *J Acquir Immune Defic Syndr* 30 [4], Seite 413-20.
- [22] Rowland-Jones, S. L.; Pinheiro, S.; Kaul, R.; Hansasuta, P.; Gillespie, G.; Dong, T.; Plummer, F. A.; Bwayo, J. B.; Fidler, S.; Weber, J.; McMichael, A. und Appay, V. (2001): How important is the 'quality' of the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in protection against HIV infection?, *Immunol Lett* 79 [1-2], Seite 15-20.
- [23] Zhu, Tuofu; Corey, Lawrence; Hwangbo, Yon; Lee, Jean M.; Learn, Gerald H.; Mullins, James I. und McElrath, M. Juliana (2003): Persistence of Extraordinarily Low Levels of Genetically Homogeneous Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Exposed Seronegative Individuals, *J. Virol.* 77 [11], Seite 6108-6116. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/77/11/6108>
- [24] Clavel, F.; Guetard, D.; Brun-Vezinet, F.; Chamaret, S.; Rey, M. A.; Santos-Ferreira, M. O.; Laurent, A. G.; Dauguet, C.; Katlama, C.; Rouzioux, C. und et, al (1986): Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS, *Science* 233 [4761], Seite 343-346. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/233/4761/343>
- [25] Guyader, M.; Emerman, M.; Sonigo, P.; Clavel, F.; Montagnier, L. und Alizon, M. (1987): Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2, *Nature* 326 [6114], Seite 662-9.
- [26] Weiss, R. A. (2001): Gulliver's travels in HIVland, *Nature* 410 [6831], Seite 963-7.
- [27] Negroni, Matteo und Buc, Henri (2000): Copy-choice recombination by reverse transcriptases: Reshuffling of genetic markers mediated by RNA chaperones, *PNAS* 97 [12], Seite 6385-6390. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/97/12/6385>

- [28] Carr, J. K.; Salminen, M. O.; Koch, C.; Gotte, D.; Artenstein, A. W.; Hegerich, P. A.; St Louis, D.; Burke, D. S. und McCutchan, F. E. (1996): Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand, *J. Virol.* 70 [9], Seite 5935-5943. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/70/9/5935>
- [29] Gao, F.; Robertson, D. L.; Morrison, S. G.; Hui, H.; Craig, S.; Decker, J.; Fultz, P. N.; Girard, M.; Shaw, G. M.; Hahn, B. H. und Sharp, P. M. (1996): The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin, *J. Virol.* 70 [10], Seite 7013-7029. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/70/10/7013>
- [30] Abecasis, Ana B.; Lemey, Philippe; Vidal, Nicole; de Oliveira, Tulio; Peeters, Martine; Camacho, Ricardo; Shapiro, Beth; Rambaut, Andrew und Vandamme, Anne-Mieke (2007): Recombination Confounds the Early Evolutionary History of Human Immunodeficiency Virus Type 1: Subtype G Is a Circulating Recombinant Form, *J. Virol.* 81 [16], Seite 8543-8551. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/81/16/8543>
- [31] Taylor, Barbara S.; Sobieszczyk, Magdalena E.; McCutchan, Francine E. und Hammer, Scott M. (2008): The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity, *N. Engl. J. Med.* 358 [15], Seite 1590-1602. URL: <http://content.nejm.org>
- [32] Altfeld, Marcus; Addo, Marylyn M.; Shankarappa, Raj; Lee, Paul K.; Allen, Todd M.; Yu, Xu G.; Rathod, Almas; Harlow, Jason; O'Sullivan, Kristin; Johnston, Mary N.; Goulder, Philip J. R.; Mullins, James I.; Rosenberg, Eric S.; Brander, Christian; Korber, Bette und Walker, Bruce D. (2003): Enhanced Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific T-Cell Responses to Highly Variable Regions by Using Peptides Based on Autologous Virus Sequences, *J. Virol.* 77 [13], Seite 7330-7340. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/77/13/7330>
- [33] Dorrell, Lucy; Dong, Tao; Ogg, Graham S.; Lister, Simon; McAdam, Steve; Rostron, Tim; Conlon, Chris; McMichael, Andrew J. und Rowland-Jones, Sarah L. (1999): Distinct Recognition of Non-Clade B Human Immunodeficiency Virus Type 1 Epitopes by Cytotoxic T Lymphocytes Generated from Donors Infected in Africa, *J. Virol.* 73 [2], Seite 1708-1714. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/73/2/1708>
- [34] McMichael, A. J. und Hanke, T. (2003): HIV vaccines 1983-2003, *Nat Med* 9 [7], Seite 874-80.
- [35] Peeters, M.; Courgnaud, V.; Abela, B.; Auzel, P.; Pourrut, X.; Bibollet-Ruche, F.; Loul, S.; Liegeois, F.; Butel, C.; Koulagna, D.; Mpoudi-Ngole, E.; Shaw, G. M.; Hahn, B. H. und Delaporte, E. (2002): Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat, *Emerg Infect Dis* 8 [5], Seite 451-7.
- [36] Kraus, G.; Werner, A.; Baier, M.; Binniger, D.; Ferdinand, F. J.; Norley, S. und Kurth, R. (1989): Isolation of Human Immunodeficiency Virus-Related Simian Immunodeficiency Viruses from African Green Monkeys, *PNAS* 86 [8], Seite 2892-2896. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/86/8/2892>
- [37] Hirsch, V. M.; Edmondson, P.; Murphey-Corb, M.; Arbeille, B.; Johnson, P. R. und Mullins, J. I. (1989): SIV adaptation to human cells, *Nature* 341 [6243], Seite 573-4.
- [38] Letvin, N. L.; Daniel, M. D.; Sehgal, P. K.; Desrosiers, R. C.; Hunt, R. D.; Waldron, L. M.; MacKey, J. J.; Schmidt, D. K.; Chalifoux, L. V. und King, N. W. (1985): Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III, *Science* 230 [4721], Seite 71-73. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/230/4721/71>
- [39] Zhu, T.; Korber, B. T.; Nahmias, A. J.; Hooper, E.; Sharp, P. M. und Ho, D. D. (1998): An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic, *Nature* 391 [6667], Seite 594-7.

- [40] Korber, B.; Muldoon, M.; Theiler, J.; Gao, F.; Gupta, R.; Lapedes, A.; Hahn, B. H.; Wolinsky, S. und Bhattacharya, T. (2000): Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains, *Science* 288 [5472], Seite 1789-1796. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/288/5472/1789>
- [41] Gao, F.; Bailes, E.; Robertson, D. L.; Chen, Y.; Rodenburg, C. M.; Michael, S. F.; Cummins, L. B.; Arthur, L. O.; Peeters, M.; Shaw, G. M.; Sharp, P. M. und Hahn, B. H. (1999): Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*, *Nature* 397 [6718], Seite 436-41.
- [42] Huet, T.; Cheynier, R.; Meyerhans, A.; Roelants, G. und Wain-Hobson, S. (1990): Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1, *Nature* 345 [6273], Seite 356-9.
- [43] Hirsch, V. M.; Olmsted, R. A.; Murphey-Corb, M.; Purcell, R. H. und Johnson, P. R. (1989): An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2, *Nature* 339 [6223], Seite 389-92.
- [44] Hahn, Beatrice H.; Shaw, George M.; De, Kevin M.; Cock und Sharp, Paul M. (2000): AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications, *Science* 287 [5453], Seite 607-614. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/287/5453/607>
- [45] Perrin, L.; Kaiser, L. und Yerly, S. (2003): Travel and the spread of HIV-1 genetic variants, *Lancet Infect Dis* 3 [1], Seite 22-7.
- [46] Beer, Brigitte E.; Foley, Brian T.; Kuiken, Carla L.; Tooze, Zena; Goeken, Robert M.; Brown, Charles R.; Hu, Jinjie; Claire, Marisa St; Korber, Bette T. und Hirsch, Vanessa M. (2001): Characterization of Novel Simian Immunodeficiency Viruses from Red-Capped Mangabeys from Nigeria (SIVrcmNG409 and -NG411), *J. Virol.* 75 [24], Seite 12014-12027. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/75/24/12014>
- [47] Haseltine, W. A. (1991): Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1, *FASEB J* 5 [10], Seite 2349-2360. URL: <http://www.fasebj.org/cgi/content/abstract/5/10/2349>
- [48] Henriët, S.; Sinck, L.; Bec, G.; Gorelick, R. J.; Marquet, R. und Paillart, J. C. (2007): Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription, *Nucleic Acids Res.* 35 [15], Seite 5141-5153. URL: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/35/15/5141>
- [49] Poon, Betty; Chang, Michael A. und Chen, Irvin S. Y. (2007): Vpr Is Required for Efficient Nef Expression from Unintegrated Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA, *J. Virol.* 81 [19], Seite 10515-10523. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/81/19/10515>
- [50] Bour, S. und Strebel, K. (2003): The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release, *Microbes Infect* 5 [11], Seite 1029-39.
- [51] Singhal, Prabhat K.; Rajendra Kumar, P.; Subba Rao, Malireddi R. K. und Mahalingam, Sundarasamy (2006): Nuclear Export of Simian Immunodeficiency Virus Vpx Protein, *J. Virol.* 80 [24], Seite 12271-12282. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/80/24/12271>
- [52] Baur, A. (2004): Functions of the HIV-1 Nef protein, *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4 [4], Seite 309-13.
- [53] Stevenson, M. (2003): HIV-1 pathogenesis, *Nat Med* 9 [7], Seite 853-60.
- [54] Weiss, R. A. (2003): HIV and AIDS: looking ahead, *Nat Med* 9 [7], Seite 887-91.
- [55] Rowland-Jones, S. L. (1998): Survival with HIV infection: good luck or good breeding?, *Trends Genet* 14 [9], Seite 343-5.

- [56] Sauermann, U. (2001): Making the animal model for AIDS research more precise: the impact of major histocompatibility complex (MHC) genes on pathogenesis and disease progression in SIV-infected monkeys, *Curr Mol Med* 1 [4], Seite 515-22.
- [57] Cocchi, Fiorenza; DeVico, Anthony L.; Garzino-Demo, Alfredo; Arya, Suresh K.; Gallo, Robert C. und Lusso, Paolo (1995): Identification of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8+ T Cells, *Science* 270 [5243], Seite 1811-1815. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/270/5243/1811>
- [58] McMichael, A. J. und Rowland-Jones, S. L. (2001): Cellular immune responses to HIV, *Nature* 410 [6831], Seite 980-7.
- [59] Baier, M. und Kurth, R. (1997): Fighting HIV-1 with IL-16, *Nat Med* 3 [6], Seite 605-6.
- [60] Baier, M.; Werner, A.; Bannert, N.; Metzner, K. und Kurth, R. (1995): HIV suppression by interleukin-16, *Nature* 378 [6557], Seite 563.
- [61] Bannert, Norbert; Avots, Andris; Baier, Michael; Serfling, Edgar und Kurth, Reinhard (1999): GA-binding protein factors, in concert with the coactivator CREB binding protein/p300, control the induction of the interleukin 16 promoter in T lymphocytes, *PNAS* 96 [4], Seite 1541-1546. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/96/4/1541>
- [62] Goldschmidt, V.; Bleiber, G.; May, M.; Martinez, R.; Ortiz, M. und Telenti, A. (2006): Role of common human TRIM5alpha variants in HIV-1 disease progression, *Retrovirology* 3, Seite 54.
- [63] Stremlau, Matthew; Perron, Michel; Lee, Mark; Li, Yuan; Song, Byeongwoon; Javanbakht, Hassan; Diaz-Griffero, Felipe; Anderson, Donovan J.; Sundquist, Wesley I. und Sodroski, Joseph (2006): From the Cover: Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5{alpha} restriction factor, *PNAS* 103 [14], Seite 5514-5519. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/103/14/5514>
- [64] Song, Byeongwoon; Javanbakht, Hassan; Perron, Michel; Park, Do Hyun; Stremlau, Matthew und Sodroski, Joseph (2005): Retrovirus Restriction by TRIM5{alpha} Variants from Old World and New World Primates, *J. Virol.* 79 [7], Seite 3930-3937. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/79/7/3930>
- [65] Shibata, R.; Sakai, H.; Kawamura, M.; Tokunaga, K. und Adachi, A. (1995): Early replication block of human immunodeficiency virus type 1 in monkey cells, *J. Gen. Virol.* 76 [11], Seite 2723-2730. URL: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/76/11/2723>
- [66] Lee, Seung-Jae; Garza, Laura; Yao, Jun; Notkins, Abner L. und Zhou, Paul (2004): A Nonneutralizing Anti-HIV-1 Antibody Turns into a Neutralizing Antibody When Expressed on the Surface of HIV-1-Susceptible Cells: A New Way to Fight HIV, *J. Immunol.* 173 [7], Seite 4618-4626. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/173/7/4618>
- [67] Fust, G.; Dierich, M. P. und Hidvegi, T. (1995): Role of humoral factors in the progression of HIV disease, *Immunol Today* 16 [4], Seite 167-9.
- [68] Mitchell, W. M.; Torres, J.; Johnson, P. R.; Hirsch, V.; Yilma, T.; Gardner, M. B. und Robinson, W. E. (1995): Antibodies to the putative SIV infection-enhancing domain diminish beneficial effects of an SIV gp160 vaccine in rhesus macaques, *AIDS* 9 [1], Seite 27-34.
- [69] Montelaro, R. C.; Grund, C.; Raabe, M.; Woodson, B.; Cook, R. F.; Cook, S. und Issel, C. J. (1996): Characterization of protective and enhancing immune responses to equine infectious anemia virus resulting from experimental vaccines, *AIDS Res Hum Retroviruses* 12 [5], Seite 413-5.

- [70] Siebelink, K. H.; Huisman, W.; Karlas, J. A.; Rimmelzwaan, G. F.; Bosch, M. L. und Osterhaus, A. D. (1995): Neutralization of feline immunodeficiency virus by polyclonal feline antibody: simultaneous involvement of hypervariable regions 4 and 5 of the surface glycoprotein, *J. Virol.* 69 [8], Seite 5124-5127. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/69/8/5124>
- [71] Letvin, N. L. und Walker, B. D. (2003): Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections, *Nat Med* 9 [7], Seite 861-6.
- [72] Ruprecht, R. M.; Ferrantelli, F.; Kitabwalla, M.; Xu, W. und McClure, H. M. (2003): Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge, *Vaccine* 21 [24], Seite 3370-3.
- [73] Check, E. (2003): AIDS vaccines: back to 'plan A', *Nature* 423 [6943], Seite 912-4.
- [74] Alberts, Bruce ; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith und Walter, Peter (1995): *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage, Seite Wiley-VCH, Weinheim.
- [75] Sissons, J. G. und Oldstone, M. B. (1980): Antibody-mediated destruction of virus-infected cells, *Adv Immunol* 29, Seite 209-60.
- [76] Banapour, B.; Sernatinger, J. und Levy, J. A. (1986): The AIDS-associated retrovirus is not sensitive to lysis or inactivation by human serum, *Virology* 152 [1], Seite 268-71.
- [77] Dierich, M. P.; Frank, I.; Stoiber, H.; Clivio, A.; Spruth, M.; Steindl, F. und Katinger, H. W. (1996): The envelope of HIV, *Immunol Lett* 54 [2-3], Seite 205-6.
- [78] Marschang, P.; Sodroski, J.; Wurzner, R. und Dierich, M. P. (1995): Decay-accelerating factor (CD55) protects human immunodeficiency virus type 1 from inactivation by human complement, *Eur J Immunol* 25 [1], Seite 285-90.
- [79] Montefiori, D. C.; Cornell, R. J.; Zhou, J. Y.; Zhou, J. T.; Hirsch, V. M. und Johnson, P. R. (1994): Complement control proteins, CD46, CD55, and CD59, as common surface constituents of human and simian immunodeficiency viruses and possible targets for vaccine protection, *Virology* 205 [1], Seite 82-92.
- [80] Saifuddin, M.; Parker, C. J.; Peeples, M. E.; Gorny, M. K.; Zolla-Pazner, S.; Ghassemi, M.; Rooney, I. A.; Atkinson, J. P. und Spear, G. T. (1995): Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1, *J. Exp. Med.* 182 [2], Seite 501-509. URL: <http://www.jem.org/cgi/content/abstract/182/2/501>
- [81] Spear, G. T.; Landay, A. L.; Sullivan, B. L.; Dittel, B. und Lint, T. F. (1990): Activation of complement on the surface of cells infected by human immunodeficiency virus, *J. Immunol.* 144 [4], Seite 1490-1496. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/144/4/1490>
- [82] Stoiber, H.; Frank, I.; Spruth, M.; Schwendinger, M.; Mullauer, B.; Windisch, J. M.; Schneider, R.; Katinger, H.; Ando, I. und Dierich, M. P. (1997): Inhibition of HIV-1 infection in vitro by monoclonal antibodies to the complement receptor type 3 (CR3): an accessory role for CR3 during virus entry?, *Mol Immunol* 34 [12-13], Seite 855-63.
- [83] Sullivan, B. L.; Knopoff, E. J.; Saifuddin, M.; Takefman, D. M.; Saarloos, M. N.; Sha, B. E. und Spear, G. T. (1996): Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo, *J. Immunol.* 157 [4], Seite 1791-1798. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/157/4/1791>

- [84] Gupta, N.; Arthos, J.; Khazanie, P.; Steenbeke, T. D.; Censoplano, N. M.; Chung, E. A.; Cruz, C. C.; Chaikin, M. A.; Daucher, M.; Kottlil, S.; Mavilio, D.; Schuck, P.; Sun, P. D.; Rabin, R. L.; Radaev, S.; Van Ryk, D.; Cicala, C. und Fauci, A. S. (2005): Targeted lysis of HIV-infected cells by natural killer cells armed and triggered by a recombinant immunoglobulin fusion protein: implications for immunotherapy, *Virology* 332 [2], Seite 491-7.
- [85] Norley, S. G.; Mikschy, U.; Werner, A.; Staszewski, S.; Helm, E. B. und Kurth, R. (1990): Demonstration of cross-reactive antibodies able to elicit lysis of both HIV-1- and HIV-2-infected cells, *J. Immunol.* 145 [6], Seite 1700-1705. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/145/6/1700>
- [86] Borrow, P.; Lewicki, H.; Hahn, B. H.; Shaw, G. M. und Oldstone, M. B. (1994): Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection, *J. Virol.* 68 [9], Seite 6103-6110. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/68/9/6103>
- [87] Koup, R. A. und Ho, D. D. (1994): Shutting down HIV, *Nature* 370 [6489], Seite 416.
- [88] Reimann, K. A.; Tenner-Racz, K.; Racz, P.; Montefiori, D. C.; Yasutomi, Y.; Lin, W.; Ransil, B. J. und Letvin, N. L. (1994): Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques, *J. Virol.* 68 [4], Seite 2362-2370. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/68/4/2362>
- [89] Folks, Thomas M.; Clouse, Kathleen A.; Justement, Jesse; Rabson, Arnold; Duh, Elia; Kehrl, John H. und Fauci, Anthony S. (1989): Tumor Necrosis Factor alpha Induces Expression of Human Immunodeficiency Virus in a Chronically Infected T-Cell Clone, 86, 7, 2365-2368, April 1, 1989, <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/86/7/2365>
- [90] Klenerman, P.; Wu, Y. und Phillips, R. (2002): HIV: current opinion in escapology, *Curr Opin Microbiol* 5 [4], Seite 408-13.
- [91] Schmitz, J.; ouml; rn, E.; Kuroda, Marcelo J.; Santra, Sampa; Sasseville, Vito G.; Simon, Meredith A.; Lifton, Michelle A.; Racz, Paul; Tenner-Racz, Klara; Dalesandro, Margaret; Scallon, Bernhard J.; Ghayeb, John; Forman, Meryl A.; Montefiori, David C.; Rieber, E. Peter; Letvin, Norman L. und Reimann, Keith A. (1999): Control of Viremia in Simian Immunodeficiency Virus Infection by CD8⁺ Lymphocytes, 283, 5403, 857-860, February 5, 1999, <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/283/5403/857>
- [92] Cao, H.; Kanki, P.; Sankale, J. L.; Dieng-Sarr, A.; Mazzara, G. P.; Kalams, S. A.; Korber, B.; Mboup, S. und Walker, B. D. (1997): Cytotoxic T-lymphocyte cross-reactivity among different human immunodeficiency virus type 1 clades: implications for vaccine development, *J. Virol.* 71 [11], Seite 8615-8623. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/71/11/8615>
- [93] Walker, B. D. und Goulder, P. J. (2000): AIDS. Escape from the immune system, *Nature* 407 [6802], Seite 313-4.
- [94] Hanke, T. (2001): Prospect of a prophylactic vaccine for HIV, *Br. Med. Bull.* 58 [1], Seite 205-218. URL: <http://bmb.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/58/1/205>
- [95] Perelson, Alan S.; Neumann, Avidan U.; Markowitz, Martin; Leonard, John M. und Ho, David D. (1996): HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time, *Science* 271 [5255], Seite 1582-1586. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/271/5255/1582>
- [96] Anikeeva, N.; Lebedeva, T.; Sumaroka, M.; Kalams, S. A. und Sykulev, Y. (2003): Soluble HIV-specific T cell receptor: expression, purification and analysis of the specificity, *J Immunol Methods* 277 [1-2], Seite 75-86.
- [97] Klein, J. und Figueroa, F. (1986): Evolution of the major histocompatibility complex, *Crit Rev Immunol* 6 [4], Seite 295-386.

- [98] Muhl, Thorsten; Krawczak, Michael; ten Haaf, Peter; Hunsmann, Gerhard und Sauer-
mann, Ulrike (2002): MHC Class I Alleles Influence Set-Point Viral Load and Survival
Time in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Monkeys, *J. Immunol.* 169 [6],
Seite 3438-3446. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/169/6/3438>
- [99] Sauermann, U.; Siddiqui, R.; Suh, Y. S.; Platzer, M.; Leuchte, N.; Meyer, H.; Matz-
Rensing, K.; Stoiber, H.; Nurnberg, P.; Hunsmann, G.; Stahl-Hennig, C. und Krawczak,
M. (2008): Mhc class I haplotypes associated with survival time in simian immunodef-
iciency virus (SIV)-infected rhesus macaques, *Genes Immun* 9 [1], Seite 69-80.
- [100] Zhu, Z. F.; Vincek, V.; Figueroa, F.; Schonbach, C. und Klein, J. (1991): Mhc-DRB genes
of the pigtail macaque (*Macaca nemestrina*): implications for the evolution of human
DRB genes, *Mol. Biol. Evol.* 8 [5], Seite 563-578. URL: <http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/8/5/563>
- [101] Lafont, Bernard A. P.; Buckler-White, Alicia; Plishka, Ron; Buckler, Charles und Martin,
Malcolm A. (2003): Characterization of Pig-Tailed Macaque Classical MHC Class I
Genes: Implications for MHC Evolution and Antigen Presentation in Macaques, *J. Immu-
nol.* 171 [2], Seite 875-885. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/171/2/875>
- [102] Smith, Miranda Z.; Dale, C. Jane; De Rose, Robert; Stratov, Ivan; Fernandez, Caroline S.;
Brooks, Andrew G.; Weinfurter, Jason; Krebs, Kendall; Riek, Cara; Watkins, David I.;
O'Connor, David H. und Kent, Stephen J. (2005): Analysis of Pigtail Macaque Major His-
tocompatibility Complex Class I Molecules Presenting Immunodominant Simian Immu-
nodeficiency Virus Epitopes, *J. Virol.* 79 [2], Seite 684-695. URL:
<http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/79/2/684>
- [103] Hartung, S.; Boller, K.; Cichutek, K.; Norley, S. G. und Kurth, R. (1992): Quantitation of
a lentivirus in its natural host: simian immunodeficiency virus in African green monkeys,
J. Virol. 66 [4], Seite 2143-2149. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/66/4/2143>
- [104] Holznagel, Edgar; Norley, Stephen; Holzammer, Silke; Coulibaly, Cheick und Kurth,
Reinhard (2002): Immunological changes in simian immunodeficiency virus (SIVagm)-
infected African green monkeys (AGM): expanded cytotoxic T lymphocyte, natural killer
and B cell subsets in the natural host of SIVagm, *J. Gen. Virol.* 83 [3], Seite 631-640.
URL: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/83/3/631>
- [105] Norley, S. und Kurth, R. (2004): The role of the immune response during SIVagm infec-
tion of the African green monkey natural host, *Front Biosci* 9, Seite 550-64.
- [106] Norley, S. G.; Kraus, G.; Ennen, J.; Bonilla, J.; Konig, H. und Kurth, R. (1990): Immu-
nological Studies of the Basis for the Apathogenicity of Simian Immunodeficiency Virus
from African Green Monkeys, *PNAS* 87 [22], Seite 9067-9071. URL:
<http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/87/22/9067>
- [107] Peters, Christian; Peng, Xiaohui; Douven, Dennis; Pan, Zhen-Kun und Paterson, Yvonne
(2003): The Induction of HIV Gag-Specific CD8+ T Cells in the Spleen and Gut-
Associated Lymphoid Tissue by Parenteral or Mucosal Immunization with Recombinant
Listeria monocytogenes HIV Gag, *J. Immunol.* 170 [10], Seite 5176-5187. URL:
<http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/170/10/5176>
- [108] Johnson, P. R.; Fomsgaard, A.; Allan, J.; Gravell, M.; London, W. T.; Olmsted, R. A. und
Hirsch, V. M. (1990): Simian immunodeficiency viruses from African green monkeys
display unusual genetic diversity, *J. Virol.* 64 [3], Seite 1086-1092. URL:
<http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/64/3/1086>
- [109] Murphey-Corb, M.; Martin, L. N.; Rangan, S. R.; Baskin, G. B.; Gormus, B. J.; Wolf, R.
H.; Andes, W. A.; West, M. und Montelaro, R. C. (1986): Isolation of an HTLV-III-
related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymp-
tomatic mangabeys, *Nature* 321 [6068], Seite 435-7.

- [110] Apetrei, Cristian; Gormus, Bobby; Pandrea, Ivona; Metzger, Michael; ten Haaf, Peter; Martin, Louis N.; Bohm, Rudolf; Alvarez, Xavier; Koopman, Gerrit; Murphey-Corb, Michael; Veazey, Ronald S.; Lackner, Andrew A.; Baskin, Gary; Heeney, Jonathan und Marx, Preston A. (2004): Direct Inoculation of Simian Immunodeficiency Virus from Sooty Mangabeys in Black Mangabeys (*Lophocebus aterrimus*): First Evidence of AIDS in a Heterologous African Species and Different Pathologic Outcomes of Experimental Infection, *J. Virol.* 78 [21], Seite 11506-11518. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/78/21/11506>
- [111] Beer, Brigitte E.; Brown, Charles R.; Whitted, Sonya; Goldstein, Simoy; Goeken, Robert; Plishka, Ronald; Buckler-White, Alicia und Hirsch, Vanessa M. (2005): Immunodeficiency in the Absence of High Viral Load in Pig-Tailed Macaques Infected with Simian Immunodeficiency Virus SIV_{sun} or SIV_{lhoest}, *J. Virol.* 79 [22], Seite 14044-14056. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/79/22/14044>
- [112] Grimm, T. A.; Beer, B. E.; Hirsch, V. M. und Clouse, K. A. (2003): Simian immunodeficiency viruses from multiple lineages infect human macrophages: implications for cross-species transmission, *J Acquir Immune Defic Syndr* 32 [4], Seite 362-9.
- [113] VandeWoude, Sue und Apetrei, Cristian (2006): Going Wild: Lessons from Naturally Occurring T-Lymphotropic Lentiviruses, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 [4], Seite 728-762. URL: <http://cmr.asm.org/cgi/content/abstract/19/4/728>
- [114] Evans, David T.; Jing, Peicheng; Allen, Todd M.; O'Connor, David H.; Horton, Helen; Venham, John E.; Piekarczyk, Marian; Dzuris, John; Dykhuzen, Marta; Mitchen, Jacques; Rudersdorf, Richard A.; Pauza, C. David; Sette, Alessandro; Bontrop, Ronald E.; DeMars, Robert und Watkins, David I. (2000): Definition of Five New Simian Immunodeficiency Virus Cytotoxic T-Lymphocyte Epitopes and Their Restricting Major Histocompatibility Complex Class I Molecules: Evidence for an Influence on Disease Progression, *J. Virol.* 74 [16], Seite 7400-7410. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/74/16/7400>
- [115] Pandrea, Ivona; Kornfeld, Christopher; Ploquin, Mickael J. Y.; Apetrei, Cristian; Faye, Abdourahmane; Rouquet, Pierre; Roques, Pierre; Simon, Francois; Barre-Sinoussi, Françoise; Muller-Trutwin, Michaela C. und Diop, Ousmane M. (2005): Impact of Viral Factors on Very Early In Vivo Replication Profiles in Simian Immunodeficiency Virus SIV_{agm}-Infected African Green Monkeys, *J. Virol.* 79 [10], Seite 6249-6259. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/79/10/6249>
- [116] Pandrea, Ivona; Ribeiro, Ruy M.; Gautam, Rajeev; Gaufin, Thaidra; Pattison, Melissa; Barnes, Mary; Monjure, Christopher; Stoulig, Crystal; Dufour, Jason; Cyprian, Wayne; Silvestri, Guido; Miller, Michael D.; Perelson, Alan S. und Apetrei, Cristian (2008): Simian Immunodeficiency Virus SIV_{agm} Dynamics in African Green Monkeys, *J. Virol.* 82 [7], Seite 3713-3724. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/82/7/3713>
- [117] Silvestri, Guido; Fedanov, Andrew; Germon, Stephanie; Kozyr, Natalia; Kaiser, William J.; Garber, David A.; McClure, Harold; Feinberg, Mark B. und Staprans, Silvija I. (2005): Divergent Host Responses during Primary Simian Immunodeficiency Virus SIV_{sm} Infection of Natural Sooty Mangabey and Nonnatural Rhesus Macaque Hosts, *J. Virol.* 79 [7], Seite 4043-4054. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/79/7/4043>
- [118] Letvin, Norman L. (2002): Strategies for an HIV vaccine, *J. Clin. Invest.* 110 [1], Seite 15-27. URL: <http://www.jci.org>
- [119] Heeney, J.; Jonker, R.; Koornstra, W.; Dubbes, R.; Niphuis, H.; Di Rienzo, A. M.; Gougeon, M. L. und Montagnier, L. (1993): The resistance of HIV-infected chimpanzees to progression to AIDS correlates with absence of HIV-related T-cell dysfunction, *J Med Primatol* 22 [2-3], Seite 194-200.

- [120] Goffinet, Christine; Allespach, Ina und Keppler, Oliver T. (2007): HIV-susceptible transgenic rats allow rapid preclinical testing of antiviral compounds targeting virus entry or reverse transcription, PNAS, Seite 0607414104. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/0607414104v1>
- [121] Stoll, M.; Claes, C.; Schulte, E.; Graf von der Schu, J. M. und Schmidt, R. E. (2002): Direct costs for the treatment of HIV-infection in a German cohort after the introduction of HAART, Eur J Med Res 7 [11], Seite 463-71.
- [122] Stoll, M. und Schmidt, R. E. (2003): Ökonomische Aspekte der ambulanten und stationären Behandlung HIV-Infizierter [Economic aspects of ambulatory and inpatient treatment of HIV positive patients], Internist (Berl) 44 [6], Seite 678, 681-90, 692-3.
- [123] Wagner, Jutta (2006): Krankheit und Armut im südlichen Afrika. Die Versorgung von AIDS-Kranken mit Medikamenten als effizientes Mittel der Armutsbekämpfung eine Stellungnahme des wissenschaftlichen Beirates beim BMZ., BMZ, Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung [BMZ spezial 140].
- [124] Deacon, N. J.; Tsykin, A.; Solomon, A.; Smith, K.; Ludford-Menting, M.; Ellett, A.; Hooker, D. J.; McPhee, D. A.; Greenway, A. L.; Chatfield, C.; Lawson, V. A.; Crowe, S.; Maerz, A.; Sonza, S.; Learmont, J.; Sullivan, J. S.; Cunningham, A.; Dwyer, D.; Dowton, D. und Mills, J. (1995): Genomic Structure of an Attenuated Quasi Species of HIV-1 from a Blood Transfusion Donor and Recipients, Science 270 [5238], Seite 988-991. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/270/5238/988>
- [125] Baba, T. W.; Jeong, Y. S.; Pennick, D.; Bronson, R.; Greene, M. F. und Ruprecht, R. M. (1995): Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques, Science 267 [5205], Seite 1820-1825. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/267/5205/1820>
- [126] Whatmore, A. M.; Cook, N.; Hall, G. A.; Sharpe, S.; Rud, E. W. und Cranage, M. P. (1995): Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence, J. Virol. 69 [8], Seite 5117-5123. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/69/8/5117>
- [127] Murphey-Corb, M.; Martin, L. N.; Davison-Fairburn, B.; Montelaro, R. C.; Miller, M.; West, M.; Ohkawa, S.; Baskin, G. B.; Zhang, J. Y. und Putney, S. (1990): A formalin inactivated whole SIV vaccine and a glycoprotein-enriched subunit vaccine confers protection against experimental challenge with pathogenic live SIV in rhesus monkeys, Dev Biol Stand 72, Seite 273-85.
- [128] Stott, E. J. (1991): Anti-cell antibody in macaques, Nature 353 [6343], Seite 393.
- [129] Berman, P. W.; Gregory, T. J.; Riddle, L.; Nakamura, G. R.; Champe, M. A.; Porter, J. P.; Wurm, F. M.; Hershberg, R. D.; Cobb, E. K. und Eichberg, J. W. (1990): Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160, Nature 345 [6276], Seite 622-5.
- [130] Norley, S.; Beer, B.; König, H.; Jensen, F. und Kurth, R. (1998): SIVmac vaccine studies using whole inactivated virus antigen sequentially depleted of viral proteins, J Med Primatol 27 [4], Seite 184-92.
- [131] Amara, Rama Rao; Villinger, Francois; Altman, John D.; Lydy, Shari L.; O'Neil, Shawn P.; Staprans, Silvija I.; Montefiori, David C.; Xu, Yan; Herndon, James G.; Wyatt, Linda S.; Candido, Maria Angelito; Kozyr, Natalia L.; Earl, Patricia L.; Smith, James M.; Ma, Hak-Ling; Grimm, Bennett D.; Hulsey, Michael L.; Miller, Joseph; McClure, Harold M.; McNicholl, Janet M.; Moss, Bernard und Robinson, Harriet L. (2001): Control of a Mucosal Challenge and Prevention of AIDS by a Multiprotein DNA/MVA Vaccine, Science 292 [5514], Seite 69-74. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/292/5514/69>

- [132] Egan, Michael A.; Charini, William A.; Kuroda, Marcelo J.; Schmitz, Jorn E.; Racz, Paul; Tenner-Racz, Klara; Manson, Kelledy; Wyand, Michael; Lifton, Michelle A.; Nickerson, Christie E.; Fu, Tongming; Shiver, John W. und Letvin, Norman L. (2000): Simian Immunodeficiency Virus (SIV) gag DNA-Vaccinated Rhesus Monkeys Develop Secondary Cytotoxic T-Lymphocyte Responses and Control Viral Replication after Pathogenic SIV Infection, *J. Virol.* 74 [16], Seite 7485-7495. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/74/16/7485>
- [133] Redfield, R. R.; Wright, D. C.; James, W. D.; Jones, T. S.; Brown, C. und Burke, D. S. (1987): Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease, *N. Engl. J. Med.* 316 [11], Seite 673-676. URL: <http://content.nejm.org>
- [134] Negri, Donatella R. M.; Baroncelli, Silvia; Catone, Stefania; Comini, Antonella; Michelini, Zuleika; Maggiorella, Maria T.; Sernicola, Leonardo; Crostarosa, Federica; Belli, Roberto; Mancini, Maria G.; Farcomeni, Stefania; Fagrouch, Zahra; Ciccozzi, Massimo; Boros, Stefano; Liljestrom, Peter; Norley, Stephen; Heeney, Jonathan und Titti, Fausto (2004): Protective efficacy of a multicomponent vector vaccine in cynomolgus monkeys after intrarectal simian immunodeficiency virus challenge, *J. Gen. Virol.* 85 [5], Seite 1191-1201. URL: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/85/5/1191>
- [135] Evans, T. G.; Keefer, M. C.; Weinhold, K. J.; Wolff, M.; Montefiori, D.; Gorse, G. J.; Graham, B. S.; McElrath, M. J.; Clements-Mann, M. L.; Mulligan, M. J.; Fast, P.; Walker, M. C.; Excler, J. L.; Duliege, A. M. und Tartaglia, J. (1999): A canarypox vaccine expressing multiple human immunodeficiency virus type 1 genes given alone or with rgp120 elicits broad and durable CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte responses in seronegative volunteers, *J Infect Dis* 180 [2], Seite 290-8.
- [136] Karnasuta, C.; Paris, R. M.; Cox, J. H.; Nitayaphan, S.; Pitisuttithum, P.; Thongcharoen, P.; Brown, A. E.; Gurunathan, S.; Tartaglia, J.; Heyward, W. L.; McNeil, J. G.; Birx, D. L. und de Souza, M. S. (2005): Antibody-dependent cell-mediated cytotoxic responses in participants enrolled in a phase I/II ALVAC-HIV/AIDS VAX B/E prime-boost HIV-1 vaccine trial in Thailand, *Vaccine* 23 [19], Seite 2522-9.
- [137] Barouch, D. H. und Nabel, G. J. (2005): Adenovirus vector-based vaccines for human immunodeficiency virus type 1, *Hum Gene Ther* 16 [2], Seite 149-56.
- [138] Barouch, Dan H.; Santra, Sampa; Tenner-Racz, Klara; Racz, Paul; Kuroda, Marcelo J.; Schmitz, Joern E.; Jackson, Shawn S.; Lifton, Michelle A.; Freed, Dan C.; Perry, Helen C.; Davies, Mary-Ellen; Shiver, John W. und Letvin, Norman L. (2002): Potent CD4⁺ T Cell Responses Elicited by a Bicistronic HIV-1 DNA Vaccine Expressing gp120 and GM-CSF, *J. Immunol.* 168 [2], Seite 562-568. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/168/2/562>
- [139] Billich, A. (2004): AIDS VAX VaxGen, *Curr Opin Investig Drugs* 5 [2], Seite 214-21.
- [140] Thorner, A. R. und Barouch, D. H. (2007): HIV-1 Vaccine Development: Progress and Prospects, *Curr Infect Dis Rep* 9 [1], Seite 71-5.
- [141] Pantaleo, G. (2008): HIV-1 T-cell vaccines: evaluating the next step, *Lancet Infect Dis* 8 [2], Seite 82-3.
- [142] Sekaly, Rafick-Pierre (2008): The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development?, *J. Exp. Med.* 205 [1], Seite 7-12. URL: <http://www.jem.org/cgi/content/abstract/205/1/7>
- [143] Steinbrook, Robert (2007): One Step Forward, Two Steps Back -- Will There Ever Be an AIDS Vaccine?, *N. Engl. J. Med.* 357 [26], Seite 2653-2655. URL: <http://content.nejm.org>

- [144] Knuth, K.; Niesalla, H.; Hueck, C. J. und Fuchs, T. M. (2004): Large-scale identification of essential *Salmonella* genes by trapping lethal insertions, *Mol Microbiol* 51 [6], Seite 1729-44.
- [145] Fensterle, Joachim; Grode, Leander; Hess, Jurgen und Kaufmann, Stefan H. E. (1999): Effective DNA Vaccination Against Listeriosis by Prime/Boost Inoculation with the Gene Gun, *J. Immunol.* 163 [8], Seite 4510-4518. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/163/8/4510>
- [146] Deml, Ludwig; Bojak, Alexandra; Steck, Stephanie; Graf, Marcus; Wild, Jens; Schirmbeck, Reinhold; Wolf, Hans und Wagner, Ralf (2001): Multiple Effects of Codon Usage Optimization on Expression and Immunogenicity of DNA Candidate Vaccines Encoding the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein, 75, 22, 10991-11001, November 15, 2001, <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/75/22/10991>
- [147] Smith, Hamilton O.; Hutchison, Clyde A., III; Pfannkoch, Cynthia und Venter, J. Craig (2003): Generating a synthetic genome by whole genome assembly: {phi}X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides, *PNAS* 100 [26], Seite 15440-15445. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/100/26/15440>
- [148] Kotsopoulou, Ekaterini; Kim, V. Narry; Kingsman, Alan J.; Kingsman, Susan M. und Mitrophanous, Kyriacos A. (2000): A Rev-Independent Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Based Vector That Exploits a Codon-Optimized HIV-1 gag-pol Gene, *J. Virol.* 74 [10], Seite 4839-4852. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/74/10/4839>
- [149] Wagner, R.; Graf, M.; Bieler, K.; Wolf, H.; Grunwald, T.; Foley, P. und Uberla, K. (2000): Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors, *Hum Gene Ther* 11 [17], Seite 2403-13.
- [150] Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol* 155, Seite 335-50.
- [151] Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 230 [4732], Seite 1350-1354. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/230/4732/1350>
- [152] Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY Vol. 1, 2, 3.
- [153] Villinger, F.; Brar, S. S.; Mayne, A.; Chikkala, N. und Ansari, A. A. (1995): Comparative sequence analysis of cytokine genes from human and nonhuman primates, *J. Immunol.* 155 [8], Seite 3946-3954. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/155/8/3946>
- [154] Loffredo, John T.; Maxwell, Jess; Qi, Ying; Glidden, Chrystal E.; Borchardt, Gretta J.; Soma, Taeko; Bean, Alex T.; Beal, Dominic R.; Wilson, Nancy A.; Rehrauer, William M.; Lifson, Jeffrey D.; Carrington, Mary und Watkins, David I. (2007): Mamu-B*08-Positive Macaques Control Simian Immunodeficiency Virus Replication, *J. Virol.* 81 [16], Seite 8827-8832. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/81/16/8827>
- [155] Suni, M. A.; Picker, L. J. und Maino, V. C. (1998): Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry, *J Immunol Methods* 212 [1], Seite 89-98.
- [156] Waldrop, S. L.; Pitcher, C. J.; Peterson, D. M.; Maino, V. C. und Picker, L. J. (1997): Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency, *J Clin Invest* 99 [7], Seite 1739-50.

- [157] Mata, M.; Yao, Z. J.; Zubair, A.; Syres, K. und Paterson, Y. (2001): Evaluation of a recombinant *Listeria monocytogenes* expressing an HIV protein that protects mice against viral challenge, *Vaccine* 19 [11-12], Seite 1435-45.
- [158] Allen, Todd M.; Mortara, Lorenzo; Mothe, Bianca R.; Liebl, Max; Jing, Peicheng; Calore, Briana; Piekarczyk, Marian; Ruddersdorf, Richard; O'Connor, David H.; Wang, X.; Wang, Chenxi; Allison, David B.; Altman, John D.; Sette, Alessandro; Desrosiers, Ronald C.; Sutter, Gerd und Watkins, David I. (2002): Tat-Vaccinated Macaques Do Not Control Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239 Replication, *J. Virol.* 76 [8], Seite 4108-4112. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/76/8/4108>
- [159] Allen, Todd M.; Vogel, Thorsten U.; Fuller, Deborah H.; Mothe, Bianca R.; Steffen, Susan; Boyson, Jon E.; Shipley, Tim; Fuller, Jim; Hanke, Tomas; Sette, Alessandro; Altman, John D.; Moss, Bernard; McMichael, Andrew J. und Watkins, David I. (2000): Induction of AIDS Virus-Specific CTL Activity in Fresh, Unstimulated Peripheral Blood Lymphocytes from Rhesus Macaques Vaccinated with a DNA Prime/Modified Vaccinia Virus Ankara Boost Regimen, *J. Immunol.* 164 [9], Seite 4968-4978. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/164/9/4968>
- [160] Custer, D. M.; Thompson, E.; Schmaljohn, C. S.; Ksiazek, T. G. und Hooper, J. W. (2003): Active and Passive Vaccination against Hantavirus Pulmonary Syndrome with Andes Virus M Genome Segment-Based DNA Vaccine, *J. Virol.* 77 [18], Seite 9894-9905. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/77/18/9894>
- [161] Putnak, Robert; Fuller, James; Vanderzanden, Lorna; Innis, Bruce L. und Vaughn, David W. (2003): VACCINATION OF RHESUS MACAQUES AGAINST DENGUE-2 VIRUS WITH A PLASMID DNA VACCINE ENCODING THE VIRAL PRE-MEMBRANE AND ENVELOPE GENES, *Am J Trop Med Hyg* 68 [4], Seite 469-476. URL: <http://www.ajtmh.org/cgi/content/abstract/68/4/469>
- [162] Schmaljohn, C.; Custer, D.; VanderZanden, L.; Spik, K.; Rossi, C. und Bray, M. (1999): Evaluation of tick-borne encephalitis DNA vaccines in monkeys, *Virology* 263 [1], Seite 166-74.
- [163] Walsh, D. S.; Gettayacamin, M.; Leitner, W. W.; Lyon, J. A.; Stewart, V. A.; Marit, G.; Pichyangkul, S.; Gosi, P.; Tongtawe, P.; Kester, K. E.; Holland, C. A.; Kolodny, N.; Cohen, J.; Voss, G.; Ballou, W. R. und Heppner, D. G. (2006): Heterologous prime-boost immunization in rhesus macaques by two, optimally spaced particle-mediated epidermal deliveries of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-encoding DNA, followed by intramuscular RTS,S/AS02A, *Vaccine* 24 [19], Seite 4167-78.
- [164] Nilsson, Charlotta; Sutter, Gerd; Walther-Jallow, Lilian; ten Haaf, Peter; Akerblom, Lenart; Heeney, Jonathan; Erfle, Volker; Bottiger, Per; Biberfeld, Gunnel und Thorstensson, Rigmor (2002): Immunization with recombinant modified vaccinia virus Ankara can modify mucosal simian immunodeficiency virus infection and delay disease progression in macaques, 83, 4, 807-818, April 1, 2002 I, <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/83/4/807>
- [165] Imaoka, K.; Ono, F.; Hamano, M.; Inouye, S. und Yoshikawa, Y. (1998): Presence of anti-ovalbumin IgE antibody in the sera of laboratory-reared squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) fed quail eggs, 47, 3, 195-7, July 1, 1998 I
- [166] Kilshaw, P. J.; McEwan, F. J.; Baker, K. C. und Cant, A. J. (1986): Studies on the specificity of antibodies to ovalbumin in normal human serum: technical considerations in the use of ELISA methods, 66, 2, 481-9, November 1, 1986

- [167] Chu, Fuliang; Lou, Zhiyong; Chen, Yu Wai; Liu, Yiwei; Gao, Bin; Zong, Lili; Khan, Abdul Hamid; Bell, John I.; Rao, Zihe und Gao, George F. (2007): First Glimpse of the Peptide Presentation by Rhesus Macaque MHC Class I: Crystal Structures of Mamu-A*01 Complexed with Two Immunogenic SIV Epitopes and Insights into CTL Escape, *J. Immunol.* 178 [2], Seite 944-952. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/178/2/944>
- [168] Hirsch, V. M.; Dapolito, G.; Goeken, R. und Campbell, B. J. (1995): Phylogeny and natural history of the primate lentiviruses, SIV and HIV, *Curr Opin Genet Dev* 5 [6], Seite 798-806.
- [169] Chakrabarti, Lisa A.; Lewin, Sharon R.; Zhang, Linqi; Gettie, Agegnehu; Luckay, Amara; Martin, Louis N.; Skulsky, Eva; Ho, David D.; Cheng-Mayer, Cecilia und Marx, Preston A. (2000): Normal T-Cell Turnover in Sooty Mangabeys Harboring Active Simian Immunodeficiency Virus Infection, *J. Virol.* 74 [3], Seite 1209-1223. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/74/3/1209>
- [170] Baier, M.; Dittmar, M. T.; Cichutek, K. und Kurth, R. (1991): Development in vivo of Genetic Variability of Simian Immunodeficiency Virus, *PNAS* 88 [18], Seite 8126-8130. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/88/18/8126>
- [171] Beer, B.; Scherer, J.; zur Megede, J.; Norley, S.; Baier, M. und Kurth, R. (1996): Lack of dichotomy between virus load of peripheral blood and lymph nodes during long-term simian immunodeficiency virus infection of African green monkeys, *Virology* 219 [2], Seite 367-75.
- [172] Carcelain, G.; Debre, P. und Autran, B. (2001): Reconstitution of CD4+ T lymphocytes in HIV-infected individuals following antiretroviral therapy, *Curr Opin Immunol* 13 [4], Seite 483-8.
- [173] Fauci, A. S. (1988): The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis, *Science* 239 [4840], Seite 617-622. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/239/4840/617>
- [174] Schmitz, J.; van Lunzen, J.; Tenner-Racz, K.; Grossschupff, G.; Racz, P.; Schmitz, H.; Dietrich, M. und Hufert, F. T. (1994): Follicular dendritic cells retain HIV-1 particles on their plasma membrane, but are not productively infected in asymptomatic patients with follicular hyperplasia, *J. Immunol.* 153 [3], Seite 1352-1359. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/153/3/1352>
- [175] Silvestri, Guido und Feinberg, Mark B. (2003): Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection, *J. Clin. Invest.* 112 [6], Seite 821-824. URL: <http://www.jci.org/cgi/content/abstract/112/6/821>
- [176] Desrosiers, R. C.; Wyand, M. S.; Kodama, T.; Ringler, D. J.; Arthur, L. O.; Sehgal, P. K.; Letvin, N. L.; King, N. W. und Daniel, M. D. (1989): Vaccine Protection against Simian Immunodeficiency Virus Infection, *PNAS* 86 [16], Seite 6353-6357. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/86/16/6353>
- [177] Norley, S. und Kurth, R. (1992): Vaccination against HIV, *Immunobiology* 184 [2-3], Seite 193-207.
- [178] Hanke, Tomas; McMichael, Andrew J. und Dorrell, Lucy (2007): Clinical experience with plasmid DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 clade A vaccine focusing on T-cell induction, *J. Gen. Virol.* 88 [1], Seite 1-12. URL: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/88/1/1>
- [179] Ou-Yang, P.; Hwang, L. H.; Tao, M. H.; Chiang, B. L. und Chen, D. S. (2002): Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: role of dendritic cells, 66, 3, 320-8, March 1, 2002

- [180] Jaffray, Ann; Shephard, Enid; van Harmelen, Joanne; Williamson, Carolyn; Williamson, Anna-Lise und Rybicki, Edward P. (2004): Human immunodeficiency virus type 1 subtype C Gag virus-like particle boost substantially improves the immune response to a subtype C gag DNA vaccine in mice, *J. Gen. Virol.* 85 [2], Seite 409-413. URL: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/85/2/409>
- [181] Kutzler, Michele A.; Robinson, Tara M.; Chattergoon, Michael A.; Choo, Daniel K.; Choo, Andrew Y.; Choe, Philip Y.; Ramanathan, Mathura P.; Parkinson, Rose; Kudchodkar, Sagar; Tamura, Yutaka; Sidhu, Maninder; Roopchand, Vidia; Kim, J. Joseph; Pavlakis, George N.; Felber, Barbara K.; Waldmann, Thomas A.; Boyer, Jean D. und Weiner, David B. (2005): Coimmunization with an Optimized IL-15 Plasmid Results in Enhanced Function and Longevity of CD8 T Cells That Are Partially Independent of CD4 T Cell Help, *J. Immunol.* 175 [1], Seite 112-123. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/175/1/112>
- [182] Burshtyn, D. N. und Barber, B. H. (1993): High occupancy binding of antigenic peptides to purified, immunoabsorbed H-2Db beta 2m molecules, *J. Immunol.* 151 [6], Seite 3070-3081. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/151/6/3070>
- [183] Sakai, T. und Himeno, K. (2003): Gene gun-based in vivo gene transfer. Application to DNA vaccination, *Methods Mol Biol* 215, Seite 181-91.
- [184] Allen, Todd M.; Mothe, Bianca R.; Sidney, John; Jing, Peicheng; Dzuris, John L.; Liebl, Max E.; Vogel, Thorsten U.; O'Connor, David H.; Wang, Xiaochi; Wussow, Michael C.; Thomson, James A.; Altman, John D.; Watkins, David I. und Sette, Alessandro (2001): CD8+ Lymphocytes from Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques Recognize 14 Different Epitopes Bound by the Major Histocompatibility Complex Class I Molecule Mamu-A*01: Implications for Vaccine Design and Testing, *J. Virol.* 75 [2], Seite 738-749. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/75/2/738>
- [185] Bannert, Norbert und Kurth, Reinhard (2004): Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation, *PNAS* 101 [suppl_2], Seite 14572-14579. URL: http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/101/suppl_2/14572
- [186] Beimforde, N.; Hanke, K.; Ammar, I.; Kurth, R. und Bannert, N. (2008): Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113, *Virology* 371 [1], Seite 216-25.
- [187] Lower, R.; Boller, K.; Hasenmaier, B.; Korbmacher, C.; Muller-Lantzsch, N.; Lower, J. und Kurth, R. (1993): Identification of Human Endogenous Retroviruses with Complex mRNA Expression and Particle Formation, *PNAS* 90 [10], Seite 4480-4484. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/90/10/4480>
- [188] Lower, Roswitha; Lower, Johannes und Kurth, Reinhard (1996): The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences, *PNAS* 93 [11], Seite 5177-5184. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/93/11/5177>
- [189] Lackner, A. A. und Veazey, R. S. (2007): Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/macaque model, *Annu Rev Med* 58, Seite 461-76.
- [190] Goldstein, Simoy; Brown, Charles R.; Ourmanov, Ilnour; Pandrea, Ivona; Buckler-White, Alicia; Erb, Christopher; Nandi, Jayashree S.; Foster, Gabriel J.; Autissier, Patrick; Schmitz, Jorn E. und Hirsch, Vanessa M. (2006): Comparison of Simian Immunodeficiency Virus SIVagmVer Replication and CD4+ T-Cell Dynamics in Vervet and Sabaues African Green Monkeys, *J. Virol.* 80 [10], Seite 4868-4877. URL: <http://jvi.asm.org/cgi/content/abstract/80/10/4868>

- [191] Vogel, Thorsten U.; Horton, Helen; Fuller, Deborah H.; Carter, Donald K.; Vielhuber, Kathy; O'Connor, David H.; Shipley, Tim; Fuller, Jim; Sutter, Gerd; Erfle, Volker; Wilson, Nancy; Picker, Louis J. und Watkins, David I. (2002): Differences Between T Cell Epitopes Recognized After Immunization and After Infection, *J. Immunol.* 169 [8], Seite 4511-4521. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/169/8/4511>
- [192] Kornfeld, Christopher; Ploquin, Mickael J. Y.; Pandrea, Ivona; Faye, Abdourahmane; Onanga, Richard; Apetrei, Cristian; Poaty-Mavoungou, Virginie; Rouquet, Pierre; Estaquier, Jerome; Mortara, Lorenzo; Desoutter, Jean-Francois; Butor, Cecile; Le Grand, Roger; Roques, Pierre; Simon, Francois; Barre-Sinoussi, Francoise; Diop, Ousmane M. und Muller-Trutwin, Michaela C. (2005): Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS, *J. Clin. Invest.* 115 [4], Seite 1082-1091. URL: <http://www.jci.org/cgi/content/abstract/115/4/1082>

Anhang I: Oligonukleotide für die Codon-Optimierung

Nr.	Bezeichnung	5'-3' Sequenz
CO1	SIVagm3gagCO_1	ATGGGCGCCGCCACCAGCGCCCTGAACCGCCGCCAGCTGGAC
CO2	SIVagm3gagCO_2	GCAGGCGAATGTGCTCGAACTTGTCCAGCTGGCGGCGGTTCA
CO3	SIVagm3gagCO_3	AAGTTCGAGCACATTTCGCTGCGCCCCACCGGCAAGAAGAAG
CO4	SIVagm3gagCO_4	AAATCAGGTGCTTAATCTGGTACTTCTTCTTGCCGGTGGGGC
CO5	SIVagm3gagCO_5	TACCAGATTAAGCACCTGATTTGGGCGGCAAGGAGATGGAG
CO6	SIVagm3gagCO_6	GGCGCTCGTGCAGGCCGAAGCGCTCCATCTCCTTGCCGGCCC
CO7	SIVagm3gagCO_7	CGCTTCGGCCTGCACGAGCGCCTGCTGGAGAGCGAGGAGGGC
CO8	SIVagm3gagCO_8	GCACCTCAATAATCTTCTTGACGCCCTCCTCGCTCTCCAGCA
CO9	SIVagm3gagCO_9	TGCAAGAAGATTATTGAGGTGCTGTACCCCTGGAGCCCACC
CO10	SIVagm3gagCO_10	GGCTCTTCAGGCCCTCGCTGCCGGTGGGCTCCAGGGGGTACA
CO11	SIVagm3gagCO_11	GGCAGCGAGGGCCTGAAGAGCCTGTTCAACCTGGTGTGCGTG
CO12	SIVagm3gagCO_12	TGTCCTTGTGCACGCAGAACAGCACGCACACCAGGTTGAACA
CO13	SIVagm3gagCO_13	CTGTTCTGCGTGCACAAGGACAAGGAGGTGAAGGACACCGAG
CO14	SIVagm3gagCO_14	GGCGCACAATGGCCACGGCCTCCTCGGTGTCTTCACCTCCT
CO15	SIVagm3gagCO_15	GAGGCCGTGGCCATTGTGCGCCAGTGCTGCCACCTGGTGGAG
CO16	SIVagm3gagCO_16	TGCGCTCGGCGTTGCGCTCCTTCTCCACCAGGTGGCAGCACT
CO17	SIVagm3gagCO_17	AAGGAGCGCAACGCCGAGCGCAACACCACCGAGACCAGCAGC
CO18	SIVagm3gagCO_18	CCTTGTCGTTCTTCTTCTGGCCGCTGCTGGTCTCGGTGGTGT
CO19	SIVagm3gagCO_19	GGCCAGAAGAAGAACGACAAGGGCGTGACCGTGCCACCCGGC
CO20	SIVagm3gagCO_20	GGGCGGGGAAGTTCTGGCTGCCGCCGGGTGGCACGGTCACGC
CO21	SIVagm3gagCO_21	GGCAGCCAGAACTTCCCCGCCAGCAGCAGGGCAACGCCTGG
CO22	SIVagm3gagCO_22	GGGGGCTCAGGGGCACGTGAATCCAGGCGTTGCCCTGCTGCT
CO23	SIVagm3gagCO_23	ATTCACGTGCCCCCTGAGCCCCCGCACCCCTGAACGCCTGGGTG
CO24	SIVagm3gagCO_24	ACTTCTTCTCCTCCACGGCCTTCACCCAGGCGTTCAGGGTGC
CO25	SIVagm3gagCO_25	AAGGCCGTGGAGGAGAAGAAGTTCGGCGCCGAGATTGTGCCC
CO26	SIVagm3gagCO_26	CCTCGCTCAGGGCCTGGAACATGGGCACAATCTCGGCGCCGA
CO27	SIVagm3gagCO_27	ATGTTCCAGGCCCTGAGCGAGGGCTGCACCCCCTACGACATT
CO28	SIVagm3gagCO_28	CCAGCACGTTTCAGCATCTGGTTAATGTCGTAGGGGGTGCAGC
CO29	SIVagm3gagCO_29	AACCAGATGCTGAACGTGCTGGGCGACCACCAGGGCGCCCTG
CO30	SIVagm3gagCO_30	TAATAATCTCCTTCACAATCTGCAGGGCGCCCTGGTGGTTCGC
CO31	SIVagm3gagCO_31	CAGATTGTGAAGGAGATTATTAACGAGGAGGCCGCCAGTGG
CO32	SIVagm3gagCO_32	CGGGAGGTGGGTGGGCAATGTCCCACTGGGCGGCCTCCTCGT
CO33	SIVagm3gagCO_33	GACATTGCCCCACCACTCCCGCCGGCCCCCTGCCCCGCCGGC
CO34	SIVagm3gagCO_34	TGCCGCGGGGGTTCGCGCAGCTGGCCGGCGGGCAGGGGGCCGG
CO35	SIVagm3gagCO_35	CAGCTGCGCGACCCCCGCGGCAGCGACATTGCCGGCACCACC
CO36	SIVagm3gagCO_36	CCAGCTGCTCCTGCACGGTGCTGGTGGTGCCGGCAATGTCGC
CO37	SIVagm3gagCO_37	AGCACCGTGCAGGAGCAGCTGGAGTGGATTACACCGCCAAC
CO38	SIVagm3gagCO_38	TGGCGCCACGTCCACGCGGGGGTTGGCGGTGTAAATCCACT
CO39	SIVagm3gagCO_39	CCCCGCGTGGACGTGGGCGCCATTTACCGCCGCTGGATTATT
CO40	SIVagm3gagCO_40	TCACGCACTTCTGCAGGCCCAGAATAATCCAGCGGCGGTAAA
CO41	SIVagm3gagCO_41	CTGGGCCTGCAGAAGTGCGTGAAGATGTACAACCCCGTGAGC
CO42	SIVagm3gagCO_42	GGCCCTGGCGAATGTCCAGCACGCTCACGGGGTTGTACATCT

Nr.	Bezeichnung	5'-3' Sequenz
CO43	SIVagm3gagCO_43	GTGCTGGACATTCGCCAGGGCCCCAAGGAGGCCTTCAAGGAC
CO44	SIVagm3gagCO_44	CCTTGTAGAAGCGGTCCACGTAGTCCTTGAAGGCCTCCTTGG
CO45	SIVagm3gagCO_45	TACGTGGACCGCTTCTACAAGGCCATTCGCGCCGAGCAGGCC
CO46	SIVagm3gagCO_46	TCCACTGCTTCACCTCGCCGCTGGCCTGCTCGGCGCGAATGG
CO47	SIVagm3gagCO_47	AGCGGCGAGGTGAAGCAGTGGATGACCGAGAGCCTGCTGATT
CO48	SIVagm3gagCO_48	TGCAGTCGGGGTTGGCGTTCTGAATCAGCAGGCTCTCGGTCA
CO49	SIVagm3gagCO_49	CAGAACGCCAACCCCGACTGCAAGGTGATTCTGAAGGGCCTG
CO50	SIVagm3gagCO_50	CCTCCAGGGTGGGGTGCATGCCCAGGCCCTTCAGAATCACCT
CO51	SIVagm3gagCO_51	GGCATGCACCCACCTGGAGGAGATGCTGACCGCCTGCCAG
CO52	SIVagm3gagCO_52	TGTAGCTGGGGCCGCCACGCCCTGGCAGGCGGTGAGCATCT
CO53	SIVagm3gagCO_53	GGCGTGGGCGGCCCCAGCTACAAGGCCAAGGTGATGGCCGAG
CO54	SIVagm3gagCO_54	GGCTCTGCATGTTCTGCATCATCTCGGCCATCACCTTGGCCT
CO55	SIVagm3gagCO_55	ATGATGCAGAACATGCAGAGCCAGAACATGATGCAGCAGGGC
CO56	SIVagm3gagCO_56	GGCGGGGGCGTCCGCGCTGGCCGCCCTGCTGCATCATGTTCT
CO57	SIVagm3gagCO_57	GGCCAGCGCGGACGCCCCCGCCACCCGTGAAGTGCTACAAC
CO58	SIVagm3gagCO_58	GCATGTGGCCGAACCTGCCGCAGTTGTAGCACTTCACGGGTG
CO59	SIVagm3gagCO_59	TGCGGCAAGTTCGGCCACATGCAGCGCCAGTGCCCCGAGCCC
CO60	SIVagm3gagCO_60	ACTTCAGGCAGCGCATCTTGCGGGGCTCGGGGCACTGGCGCT
CO61	SIVagm3gagCO_61	CGCAAGATGCGCTGCCTGAAGTGCGGCAAGCCCCGCCACCTG
CO62	SIVagm3gagCO_62	CCTGGCCGCGGCAGTCCTTGGCCAGGTGGCCGGGCTTGCCGC
CO63	SIVagm3gagCO_63	GCCAAGGACTGCCGCGGCCAGGTGAACTTCCTGGGCTACGGC
CO64	SIVagm3gagCO_64	GGGGCTTGCGGCCCATCCAGCGGCCGTAGCCCAGGAAGTTCA
CO65	SIVagm3gagCO_65	CGCTGGATGGGCGCCAAGCCCCGCAACTTCCCCGCCGCCACC
CO66	SIVagm3gagCO_66	GGGCGGTGGGCTCCACGCCCAGGGTGGCGGCGGGGAAGTTGC
CO67	SIVagm3gagCO_67	CTGGGCGTGAGCCACCGCCCCACCTCCACCCAGCCCCTAC
CO68	SIVagm3gagCO_68	GCAGCAGCTTCTTGCGGGGTCGTAGGGGCTGGGTGGAGGTG
CO69	SIVagm3gagCO_69	GACCCCGCCAAGAAGCTGCTGCAGCAGTACGCCGACAAGGGC
CO70	SIVagm3gagCO_70	TGCGCTGCTCGCGCAGCTGCTTGCCCTTGTCGGCGTACTGCT
CO71	SIVagm3gagCO_71	AAGCAGCTGCGCGAGCAGCGCAAGAAGCCACCCGCCGTGAAC
CO72	SIVagm3gagCO_72	TGTAGCCCTCGGTCCAGTCGGGGTTCACGGCGGGTGGCTTCT
CO73	SIVagm3gagCO_73	CCCGACTGGACCGAGGGCTACAGCCTGAACAGCCTGTTCGGC
CO74	SIVagm3gagCO_74	TCACTGGTCTCGCCGAACAGGCTGTTACAGG
CO75	SIVmac239GagCO_75	ATGGGCGTGCGCAACAGCGTGCTGAGCGGCAAGAAGGCCGAC
CO76	SIVmac239GagCO_76	GCAGGCGAATCTTCTCCAGCTCGTCGGCCTTCTTGCCGCTCA
CO77	SIVmac239GagCO_77	GAGCTGGAGAAGATTTCGCTGCGCCCCAACGGCAAGAAGAAG
CO78	SIVmac239GagCO_78	ACACCACGTGCTTACGATGTACTTCTTCTTGCCGTGGGGC
CO79	SIVmac239GagCO_79	TACATGCTGAAGCACGTGGTGTGGGCGCCAACGAGCTGGAC
CO80	SIVmac239GagCO_80	GGCTCTCGGCCAGGCCGAAGCGGTCCAGCTCGTTGGCGGCCC
CO81	SIVmac239GagCO_81	CGCTTCGGCCTGGCCGAGAGCCTGCTGGAGAACAAGGAGGGC
CO82	SIVmac239GagCO_82	GCACGCTCAGAATCTTCTGGCAGCCCTCCTTGTCTCCAGCA
CO83	SIVmac239GagCO_83	TGCCAGAAGATTCTGAGCGTGCTGGCCCCACTGGTGCCACC
CO84	SIVmac239GagCO_84	GGCTCTTCAGGTTCTCGCTGCCGGTGGGCACCAGTGGGGCCA
CO85	SIVmac239GagCO_85	GGCAGCGAGAACCTGAAGAGCCTGTACAACACCGTGTGCGTG
CO86	SIVmac239GagCO_86	CCTCGGCGTGAATGCACCAAATCACGCACACGGTGTGTACA

Nr.	Bezeichnung	5'-3' Sequenz
CO87	SIVmac239GagCO_87	ATTTGGTGCATTCACGCCGAGGAGAAGGTGAAGCACACCGAG
CO88	SIVmac239GagCO_88	GCTGCACAATCTGCTTGGCCTCCTCGGTGTGCTTCACCTTCT
CO89	SIVmac239GagCO_89	GAGGCCAAGCAGATTGTGTCAGCGCCACCTGGTGGTGGAGACC
CO90	SIVmac239GagCO_90	TGGGCATGGTCTCGGTGGTGCCGGTCTCCACCACCAGGTGGC
CO91	SIVmac239GagCO_91	GGCACCACCGAGACCATGCCCCAAGACCAGCCGCCCCACCGCC
CO92	SIVmac239GagCO_92	TGCCGCCGCGGCCGCTGCTGGGGGCGGTGGGGGCGGCTGGTCT
CO93	SIVmac239GagCO_93	CCCAGCAGCGGCCGCGGCGGCAACTACCCCGTGCAGCAGATT
CO94	SIVmac239GagCO_94	GCAGGTGCACGTAGTTGCCGCCAATCTGCTGCACGGGGTAGT
CO95	SIVmac239GagCO_95	GGCGGCAACTACGTGCACCTGCCCTGAGCCCCCGCACCCCTG
CO96	SIVmac239GagCO_96	CAATCAGCTTCACCCAGGCGTTTCAGGGTGCGGGGGCTCAGGG
CO97	SIVmac239GagCO_97	AACGCCTGGGTGAAGCTGATTGAGGAGAAGAAGTTCGGCGCC
CO98	SIVmac239GagCO_98	CCTGGAAGCCGGGTACCACCTCGGCGCCGAATTCTTCTCCT
CO99	SIVmac239GagCO_99	GAGGTGGTACCCGGCTTCCAGGCCCTGAGCGAGGGCTGCACC
CO100	SIVmac239GagCO_100	GCATCTGGTTAATGTCTGCTAGGGGGTGCAGCCCTCGCTCAGGG
CO101	SIVmac239GagCO_101	CCCTACGACATTAACCAGATGCTGAACTGCGTGGGCGACCAC
CO102	SIVmac239GagCO_102	ATAATCTGCATGGCGGCcTGGTGGTCGCCCACGCAGTTCAGC
CO103	SIVmac239GagCO_103	CAGGCCGCCATGCAGATTATTCGCGACATTATTAACGAGGAG
CO104	SIVmac239GagCO_104	TGCAGGTCCCAGTCGGCGGCCTCCTCGTTAATAATGTCGCGA
CO105	SIVmac239GagCO_105	GCCGCCGACTGGGACCTGCAGCACCCCCAGCCCCGCCACAG
CO106	SIVmac239GagCO_106	GGCTCGCGCAGCTGGCCCTGCTGTGGGGCGGGCTGGGGGTGC
CO107	SIVmac239GagCO_107	CAGGGCCAGCTGCGCGAGCCCAGCGGCAGCGACATTGCCGGC
CO108	SIVmac239GagCO_108	TCGTCCACGCTGCTGGTGGTGCCGGCAATGTCGCTGCCGCTG
CO109	SIVmac239GagCO_109	ACCACCAGCAGCGTGGACGAGCAGATTTCAGTGGATGTACCGC
CO110	SIVmac239GagCO_110	ACGGGAATGGGGTTCTGCTGGCGGTACATCCACTGAATCTGC
CO111	SIVmac239GagCO_111	CAGCAGAACCCCATTCCCGTGGGCAACATTTACCGCCGCTGG
CO112	SIVmac239GagCO_112	TTCTGCAGGCCCAGCTGAATCCAGCGGCGGTAAATGTTGCCC
CO113	SIVmac239GagCO_113	ATTCAGCTGGGCCTGCAGAAGTGCGTGCATGTACAACCCC
CO114	SIVmac239GagCO_114	TTACGTCCAGAATGTTGGTGGGGTTGTACATGCGCACGCAC
CO115	SIVmac239GagCO_115	ACCAACATTCTGGACGTGAAGCAGGGCCCCAAGGAGCCCTTC
CO116	SIVmac239GagCO_116	AAGCGGTCCACGTAGCTCTGGAAGGGCTCCTTGGGGCCCTGC
CO117	SIVmac239GagCO_117	CAGAGCTACGTGGACCGCTTCTACAAGAGCCTGCGCGCCGAG
CO118	SIVmac239GagCO_118	TTACGGCGGCGTCTGGTCTGCTCGGCGCGCAGGCTCTTGTAG
CO119	SIVmac239GagCO_119	CAGACCGACGCCGCCGTGAAGAACTGGATGACCCAGACCCTG
CO120	SIVmac239GagCO_120	GGGTTGGCGTTCTGAATCAGCAGGGTCTGGGTATCCAGTTC
CO121	SIVmac239GagCO_121	CTGATTCAGAACGCCAACCCCGACTGCAAGCTGGTGTGAAG
CO122	SIVmac239GagCO_122	GTGGGGTTACGCCCAGGCCCTTCAGCACCAGCTTGCAGTCG
CO123	SIVmac239GagCO_123	GGCCTGGGCGTGAACCCACCCCTCGAGGAGATGCTGACCGCC
CO124	SIVmac239GagCO_124	GGGCCGCCACGCCCTGGCAGGCGGTCAGCATCTCCTCGAGG
CO125	SIVmac239GagCO_125	TGCCAGGGCGTGGGCGGCCCCGCCAGAAGGCCCGCCTGATG
CO126	SIVmac239GagCO_126	GCCTCCTTCAGGGCCTCGGCCATCAGGCGGGCCTTCTGGCCG
CO127	SIVmac239GagCO_127	GCCGAGGCCCTGAAGGAGGCCCTGGCCCCCGTGCCATTCCC
CO128	SIVmac239GagCO_128	CGCTGCTGGGCGGCGGCGAAGGGAATGGGCACGGGGGCCAGG
CO129	SIVmac239GagCO_129	TTCGCCGCCGCCAGCAGCGCGGCCCCCGCAAGCCATTAAG
CO130	SIVmac239GagCO_130	TCCTTGCCGCAAGTTCAGCACTTAATGGGCTTGCGGGGGCCG

Nr.	Bezeichnung	5'-3' Sequenz
CO131	SIVmac239GagCO_131	TGCTGGAAGTGCAGGAGGGCCACAGCGCCCGCCAGTGC
CO132	SIVmac239GagCO_132	CCCTGGCGGCGTGGGGCGCGGCACTGGCGGGCGCTGTGGCCC
CO133	SIVmac239GagCO_133	CGCGCCCCACGCCGCCAGGGCTGCTGGAAGTGCAGGCAAGATG
CO134	SIVmac239GagCO_134	CACTTGGCCATCACGTGGTCCATCTTGCCGCACTTCCAGCAG
CO135	SIVmac239GagCO_135	GACCACGTGATGGCCAAGTGCCCCGACCGCCAGGCCGGCTTC
CO136	SIVmac239GagCO_136	CCCCAGGGGCCCAGGCCAGGAAGCCGGCCTGGCGGTCGGGG
CO137	SIVmac239GagCO_137	CTGGGCCTGGGCCCCCTGGGGCAAGAAGCCCCGCAACTTCCCC
CO138	SIVmac239GagCO_138	CCCTGGTGCACCTGGGCCATGGGGAAGTTGCGGGGCTTCTTG
CO139	SIVmac239GagCO_139	ATGGCCCAGGTGCACCAGGGCCTGATGCCACCGCCCCCtCCC
CO140	SIVmac239GagCO_140	AGGTCCACGGCGGGGTCCTCGGGAGGGGCGGTGGGCATCAGG
CO141	SIVmac239GagCO_141	GAGGACCCCGCCGTGGACCTGCTGAAGAACTACATGCAGCTG
CO142	SIVmac239GagCO_142	TTCTCGCGCTGCTGCTTGCCAGCTGCATGTAGTTCTTCAGC
CO143	SIVmac239GagCO_143	GGCAAGCAGCAGCGCGAGAAGCAGCGCGAGAGCCGCGAGAAG
CO144	SIVmac239GagCO_144	TCGGTCACCTCCTTGTAGGGCTTCTCGCGGCTCTCGCGCTGC
CO145	SIVmac239GagCO_145	CCCTACAAGGAGGTGACCGAGGACCTGCTGCACCTGAACAGC
CO146	SIVmac239GagCO_146	TCACTGGTCGCCGCCGAACAGGCTGTTTCAGGTGCAGCAGGTCC

Anhang II: 15mer SIVagmGag-Peptide

Peptid	Position	Sequenz	Peptid	Position	Sequenz
SIVagmGag1	1-15	MGAATSALNRRQLDK	SIVagmGag51	251-265	TTSTVQEQLWEIYTA
SIVagmGag2	6-20	SALNRRQLDKFEHIR	SIVagmGag52	256-270	QEQLWEIYTANPRVD
SIVagmGag3	11-25	RQLDKFEHRLRPTG	SIVagmGag53	261-275	WIYTANPRVDVGAIY
SIVagmGag4	16-30	FEHRLRPTGKKKYQ	SIVagmGag54	266-280	NPRVDVGAIYRRWII
SIVagmGag5	21-35	LRPTGKKKYQIKHLI	SIVagmGag55	271-285	VGAIYRRWIILGLQK
SIVagmGag6	26-40	KKKYQIKHLIWAGKE	SIVagmGag56	276-290	RRWIILGLQKCVKMY
SIVagmGag7	31-45	IKHLIWAGKEMERFG	SIVagmGag57	281-295	LGLQKCVKMYNPVSV
SIVagmGag8	36-50	WAGKEMERFGLHERL	SIVagmGag58	286-300	CVKMYNPVSVLDIRQ
SIVagmGag9	41-55	MERFGLHERLLESEE	SIVagmGag59	291-305	NPVSVLDIRQGPKEA
SIVagmGag10	46-60	LHERLLESEEGCKKI	SIVagmGag60	296-310	LDIRQGPKEAFKDYV
SIVagmGag11	51-65	LESEEGCKKIIEVLY	SIVagmGag61	301-315	GPKEAFKDYVDRFYK
SIVagmGag12	56-70	GCKKIIEVLYPLEPT	SIVagmGag62	306-320	FKDYVDRFYKAIRAE
SIVagmGag13	61-75	IEVLYPLEPTGSEGL	SIVagmGag63	311-325	DRFYKAIRAEQASGE
SIVagmGag14	66-80	PLEPTGSEGLKSLFN	SIVagmGag64	316-330	AIRAEQASGEVKQWM
SIVagmGag15	71-85	GSEGLKSLFNLVCVL	SIVagmGag65	321-335	QASGEVKQWMTESLL
SIVagmGag16	76-90	KSLFNLVCVLFVHK	SIVagmGag66	326-340	VKQWMTESLLIQNAN
SIVagmGag17	81-95	LVCVLFVHKDKKEVK	SIVagmGag67	331-345	TESLLIQNANPDCKV
SIVagmGag18	86-100	FCVHKDKKEVDTEEA	SIVagmGag68	336-350	IQNANPDCKVILKGL
SIVagmGag19	91-105	DKEVKDTEEAIVR	SIVagmGag69	341-355	PDCKVILKGLGMHPT
SIVagmGag20	96-110	DTEEAIVRQCCHL	SIVagmGag70	346-360	ILKGLGMHPTLEML
SIVagmGag21	101-115	VAIVRQCCHLVEKER	SIVagmGag71	351-365	GMHPTLEMLTACQG
SIVagmGag22	106-120	QCCHLVEKERNARN	SIVagmGag72	356-370	LEMLTACQGVGGPS
SIVagmGag23	111-125	VEKERNARNTTETS	SIVagmGag73	361-375	TACQGVGGPSYKAKV
SIVagmGag24	116-130	NAERNTTETSSGQKK	SIVagmGag74	366-380	VGGPSYKAKVMAEMM
SIVagmGag25	121-135	TTETSSGQKKNDKGV	SIVagmGag75	371-385	YKAKVMAEMMQNMQS
SIVagmGag26	126-140	SGQKKNDKGVTPPG	SIVagmGag76	376-390	MAEMMQNMQSQNM MQ
SIVagmGag27	131-145	NDKGVTPPGGSQNF	SIVagmGag77	381-395	QNMQSQNM MQQGGQR
SIVagmGag28	136-150	TVPPGGSQNFPAQQQ	SIVagmGag78	386-400	QNM MQQGGQRGRPRP
SIVagmGag29	141-155	GSQNFPAQQQGNAWI	SIVagmGag79	391-405	QGGQRGRPRPPVKCY
SIVagmGag30	146-160	PAQQQGNAWIHVPLS	SIVagmGag80	396-410	GRPRPPVKCYNCGKF
SIVagmGag31	151-165	GNAWIHVPLSPRTL	SIVagmGag81	401-415	PVKCYNCGKFGHMQR
SIVagmGag32	156-170	HVPLSPRTLNAWVKA	SIVagmGag82	406-420	NCGKFGHMQRQCPEP
SIVagmGag33	161-175	PRTLNAWVKAVEEKK	SIVagmGag83	411-425	GHMQRQCPEPRKMRC
SIVagmGag34	166-180	AWVKAVEEKKFGAEI	SIVagmGag84	416-430	QCPEPRKMRLCKCGK
SIVagmGag35	171-185	VEEKKFGAEIVPMFQ	SIVagmGag85	421-435	RKMRLCKCGKPGHLA
SIVagmGag36	176-190	FGAEIVPMFQALSEG	SIVagmGag86	426-440	LKCGKPGHLAKDCRG
SIVagmGag37	181-195	VPMFQALSEGCTPYD	SIVagmGag87	431-445	PGHLAKDCRGQVNFL
SIVagmGag38	186-200	ALSEGCTPYDINQML	SIVagmGag88	436-450	KDCRGQVNFLGYGRW
SIVagmGag39	191-205	CTPYDINQMLNVLGD	SIVagmGag89	441-455	QVNFLGYGRWMGAKP
SIVagmGag40	196-210	INQMLNVLGDHQGAL	SIVagmGag90	446-460	GYGRWMGAKPRNFPA
SIVagmGag41	201-215	NVLGDHQGALQIVKE	SIVagmGag91	451-465	MGAKPRNFPAATLG V
SIVagmGag42	206-220	HQGALQIVKEIINEE	SIVagmGag92	456-470	RNFPAATLGVEPTAP
SIVagmGag43	211-225	QIVKEIINEEAAQWD	SIVagmGag93	461-475	ATLGVEPTAPPPSP
SIVagmGag44	216-230	IINEEAAQWDIAHPP	SIVagmGag94	466-480	EPTAPPPSPYDPAK
SIVagmGag45	221-235	AAQWDIAHPPAGPL	SIVagmGag95	471-485	PPSPYDPAKLLQ
SIVagmGag46	226-240	IAHPPAGPLPAGQL	SIVagmGag96	476-490	YDPAKLLQYADKG
SIVagmGag47	231-245	PAGPLPAGQLRDPGR	SIVagmGag97	481-495	KLLQYADKGKQLRE
SIVagmGag48	236-250	PAGQLRDPGRSDIAG	SIVagmGag98	486-500	YADKGKQLREQRKKP
SIVagmGag49	241-255	RDPRGSDIAGTTSTV	SIVagmGag99	491-505	KQLREQRKKPPAVNP
SIVagmGag50	246-260	SDIAGTTSTVQEQL	SIVagmGag100	496-510	QRKKPPAVNPDWTEG

Anhang III: 15mer SIVmacGag-Peptide

Peptid	Position	Sequenz (C-N)	Peptid	Position	Sequenz (C-N)
SIVmacGag1	1-15	MGVRNSVLSGKKADE	SIVmacGag56	221-233	PAPQQGQLREPSGSD
SIVmacGag2	5-19	NSVLSGKKADELEKI	SIVmacGag57	225-237	QGQLREPSGSDIAGT
SIVmacGag3	9-23	SGKKADELEKIRLRP	SIVmacGag58	229-241	REPSGSDIAGTTSSV
SIVmacGag4	13-27	ADELEKIRLRPNNGKK	SIVmacGag59	233-245	GSDIAGTTSSVDEQI
SIVmacGag5	17-31	EKIRLRPNNGKKKYML	SIVmacGag60	237-249	AGTTSSVDEQIQWMY
SIVmacGag6	21-35	LRPNNGKKKYMLKHVV	SIVmacGag61	241-253	SSVDEQIQWMYRQQN
SIVmacGag7	25-39	GKKKYMLKHVVWAAN	SIVmacGag62	245-257	EQIQWMYRQQNPPIV
SIVmacGag8	29-43	YMLKHVVWAANELDR	SIVmacGag63	249-261	WMYRQQNPPIVGNIY
SIVmacGag9	33-47	HVVWAANELDRFGLA	SIVmacGag64	253-265	QQNPPIVGNIYRRWI
SIVmacGag10	37-51	AANELDRFGLAESLL	SIVmacGag65	257-269	IPVGNIYRRWIQLGL
SIVmacGag11	41-55	LDRFGLAESLLENKE	SIVmacGag66	261-273	NIYRRWIQLGLQKCV
SIVmacGag12	45-59	GLAESLLENKEGCQK	SIVmacGag67	265-277	RWIQLGLQKCVRMYN
SIVmacGag13	49-63	SLENKEGCQKILSV	SIVmacGag68	269-281	LGLQKCVRMYNPTNI
SIVmacGag14	53-67	NKEGCQKILSVLAPL	SIVmacGag69	273-285	KCVRMYNPTNILDVK
SIVmacGag15	57-71	CQKILSVLAPLVPTG	SIVmacGag70	277-289	MYNPTNILDVKQGP
SIVmacGag16	61-75	LSVLAPLVPTGSEN	SIVmacGag71	281-293	TNILDVKQGPKEPFQ
SIVmacGag17	65-79	APLVPTGSENKSLY	SIVmacGag72	285-297	DVKQGPKEPFQSYVD
SIVmacGag18	69-83	PTGSENKSLYNTVC	SIVmacGag73	289-301	GPKEPFQSYVDRFYK
SIVmacGag19	73-87	ENLKSLYNTVCVIWC	SIVmacGag74	293-305	PFQSYVDRFYKSLRA
SIVmacGag20	77-91	SLYNTVCVIWCHAE	SIVmacGag75	297-309	YVDRFYKSLRAEQTD
SIVmacGag21	81-95	TVCVIWCHAEKVK	SIVmacGag76	301-313	FYKSLRAEQTDAAVK
SIVmacGag22	85-99	IWCHAEKVKHTEE	SIVmacGag77	305-317	LRAEQTDAAVKNWMT
SIVmacGag23	89-103	HAEEKVKHTEEAQKI	SIVmacGag78	309-321	QTDAAVKNWMTQTLL
SIVmacGag24	93-107	KVKHTEEAQKIVQRH	SIVmacGag79	313-325	AVKNWMTQTLLIQNA
SIVmacGag25	97-111	TEEAQKIVQRHLVVE	SIVmacGag80	317-329	WMTQTLLIQNANPDC
SIVmacGag26	101-115	KQIVQRHLVVETGTT	SIVmacGag81	321-333	TLLIQNANPDCKLVL
SIVmacGag27	105-119	QRHLVVETGTTETMP	SIVmacGag82	325-337	QNANPDCKLVLKGLG
SIVmacGag28	109-123	VVETGTTETMPKTSR	SIVmacGag83	329-341	PDCKLVLKGLGVNPT
SIVmacGag29	113-125	GTTETMPKTSRPTAP	SIVmacGag84	333-345	LVLKGLGVNPTLEEM
SIVmacGag30	117-129	TPKTSRPTAPSSGR	SIVmacGag85	337-351	GLGVNPTLEEMLTAC
SIVmacGag31	121-133	TSRPTAPSSGRGGNY	SIVmacGag86	341-355	NPTLEEMLTACQGVG
SIVmacGag32	125-137	TAPSSGRGGNYPVQQ	SIVmacGag87	345-359	EEMLTACQGVGGPGQ
SIVmacGag33	129-141	SGRGGNYPVQQIGGN	SIVmacGag88	349-363	TACQGVGGPGQKARL
SIVmacGag34	133-145	GNYPVQQIGGNVHL	SIVmacGag89	353-367	GVGGPGQKARLMAEA
SIVmacGag35	137-149	VQQIGGNVHLPLSP	SIVmacGag90	357-371	PGQKARLMAEALKEA
SIVmacGag36	141-153	GGNVHLPLSPRTL	SIVmacGag91	361-375	ARLMAEALKEALAPV
SIVmacGag37	145-157	VHLPLSPRTLNAWVK	SIVmacGag92	365-379	AEALKEALAPVPIPF
SIVmacGag38	149-161	LSPRTLNAWVKLIEE	SIVmacGag93	369-383	KEALAPVPIPFAAAQ
SIVmacGag39	153-165	TLNAWVKLIEEKKFG	SIVmacGag94	373-387	APVPIPFAAAQQRGP
SIVmacGag40	157-169	WVKLIEEKKFGAEVV	SIVmacGag95	377-391	IPFAAAQQRGPRKPI
SIVmacGag41	161-173	IEEKKFGAEVVPGFQ	SIVmacGag96	381-395	AAQQRGPRKPIKCWN
SIVmacGag42	165-177	KFGAEVVPGFQALSE	SIVmacGag97	385-399	RGPRKPIKCWNCGKE
SIVmacGag43	169-181	EVVPGFQALSEGCTP	SIVmacGag98	389-403	KPIKCWNCGKEGHS
SIVmacGag44	173-185	GFQALSEGCTPYDIN	SIVmacGag99	393-407	CWNCGKEGHSARQCR
SIVmacGag45	177-189	LSEGCTPYDINQMLN	SIVmacGag100	397-411	GKEGHSARQCRAPRR
SIVmacGag46	181-193	CTPYDINQMLNCVGD	SIVmacGag101	401-415	HSARQCRAPRRQGCW
SIVmacGag47	185-197	DINQMLNCVGDHQA	SIVmacGag102	405-419	QCRAPRRQGCWKCGK
SIVmacGag48	189-201	MLNCVGDHQAAMQII	SIVmacGag103	409-423	PRRQGCWKCGKMDHV
SIVmacGag49	193-205	VGDHQAAMQIIRDII	SIVmacGag104	413-427	GCWKCGKMDHVMAKC
SIVmacGag50	197-209	QAAMQIIRDIINEEA	SIVmacGag105	417-431	CGKMDHVMAKCPDRQ
SIVmacGag51	201-213	QIIRDIINEEAADWD	SIVmacGag106	421-435	DHVMAKCPDRQAGFL
SIVmacGag52	205-217	DIINEEAADWDLQHP	SIVmacGag107	425-439	AKCPDRQAGFLGLGP
SIVmacGag53	209-221	EEAADWDLQHPQPAP	SIVmacGag108	429-443	DRQAGFLGLGPWGKK
SIVmacGag54	213-225	DWDLQHPQPAPQQGQ	SIVmacGag109	433-447	GFLGLGPWGKKPRNF
SIVmacGag55	217-229	QHPQPAPQQGQLREP	SIVmacGag110	437-451	LGPWGKKPRNFPMAQ

Peptid	Position	Sequenz (C-N)	Peptid	Position	Sequenz (C-N)
SIVmacGag111	441-455	GKKPRNFPMAQVHQG	SIVmacGag119	473-487	YMLGKQQREKQRES
SIVmacGag112	445-459	RNFPMAQVHQGLMPT	SIVmacGag120	477-491	GKQREKQRESREKP
SIVmacGag113	449-463	MAQVHQGLMPTAPPE	SIVmacGag121	481-495	REKQRESREKPYKEV
SIVmacGag114	453-467	HQGLMPTAPPEDPAV	SIVmacGag122	485-499	RESREKPYKEVTEDL
SIVmacGag115	457-471	MPTAPPEDPAVDLLK	SIVmacGag123	489-503	EKPYKEVTEDLLHLN
SIVmacGag116	461-475	PPEDPAVDLLKNYMQ	SIVmacGag124	493-507	KEVTEDLLHLNSLFG
SIVmacGag117	465-479	PAVDLLKNYMLGKQ	SIVmacGag125	497-511	EDLLHLNSLFGGDQ
SIVmacGag118	469-483	LLKNYMLGKQQREK			

Anhang IV: 15mer HIV-1Gag-Peptide

Peptid	Position	Sequenz (C-N)	Peptid	Position	Sequenz (C-N)
HIV-1Gag1	1-15	MGARASVLSGGKLDA	HIV-1Gag56	221-233	GPIPPGQMREPRGSD
HIV-1Gag2	5-19	ASVLSGGKLDAWEKI	HIV-1Gag57	225-237	PGQMREPRGSDIAGT
HIV-1Gag3	9-23	SGGKLDAWEKIRLRP	HIV-1Gag58	229-241	REPRGSDIAGTTSTP
HIV-1Gag4	13-27	LDAWEKIRLRPGGKK	HIV-1Gag59	233-245	GSDIAGTTSTPQEQI
HIV-1Gag5	17-31	EKIRLRPGGKKKYRL	HIV-1Gag60	237-249	AGTTSTPQEQIGWMT
HIV-1Gag6	21-35	LRPGGKKKYRLKHLV	HIV-1Gag61	241-253	STPQEQIGWMTSNPP
HIV-1Gag7	25-39	GKKKYRLKHLVWASR	HIV-1Gag62	245-257	EQIGWMTSNPPPIVG
HIV-1Gag8	29-43	YRLKHLVWASRELER	HIV-1Gag63	249-261	WMTSNPPPIVGDIYK
HIV-1Gag9	33-47	HLVWASRELERFALN	HIV-1Gag64	253-265	NPPPIVGDIYKRWII
HIV-1Gag10	37-51	ASRELERFALNPSLL	HIV-1Gag65	257-269	PVGDIYKRWIILGLN
HIV-1Gag11	41-55	LERFALNPSLLETAE	HIV-1Gag66	261-273	IYKRWIILGLNKNIVR
HIV-1Gag12	45-59	ALNPSLLETAEGCQQ	HIV-1Gag67	265-277	WIILGLNKNIVRMYS
HIV-1Gag13	49-63	SLLETAEGCQQIMEQ	HIV-1Gag68	269-281	GLNKNIVRMYSVPSIL
HIV-1Gag14	53-67	TAEGCQQIMEQLQPA	HIV-1Gag69	273-285	IVRMYSVPSILDIKQ
HIV-1Gag15	57-71	CQQIMEQLQPALKTG	HIV-1Gag70	277-289	YSPVSILDIKQGPKE
HIV-1Gag16	61-75	MEQLQPALKTGTEEL	HIV-1Gag71	281-293	SILDIKQGPKEPFRD
HIV-1Gag17	65-79	QPALKTGTEELRSLY	HIV-1Gag72	285-297	IKQGPKEPFRDYVDR
HIV-1Gag18	69-83	KTGTEELRSLYNTVA	HIV-1Gag73	289-301	PKEPFRDYVDRFFKT
HIV-1Gag19	73-87	EELRSLYNTVATLYC	HIV-1Gag74	293-305	FRDYVDRFFKTLRAE
HIV-1Gag20	77-91	SLYNTVATLYCVHQR	HIV-1Gag75	297-309	VDRFFKTLRAEQATQ
HIV-1Gag21	81-95	TVATLYCVHQRIDVK	HIV-1Gag76	301-313	FKTLRAEQATQDVKN
HIV-1Gag22	85-99	LYCVHQRIDVKDTKE	HIV-1Gag77	305-317	RAEQATQDVKNWMT
HIV-1Gag23	89-103	HQRIDVKDTKEALDK	HIV-1Gag78	309-321	ATQDVKNWMTETLLV
HIV-1Gag24	93-107	DVKDTKEALDKIEEI	HIV-1Gag79	313-325	VKNWMTETLLVQNaN
HIV-1Gag25	97-111	TKEALDKIEEIQNKS	HIV-1Gag80	317-329	MTETLLVQNaNPDCK
HIV-1Gag26	101-115	LDKIEEIQNKSQKT	HIV-1Gag81	321-333	LLVQNaNPDCKSILR
HIV-1Gag27	105-119	EEIQNKSQKTQQA	HIV-1Gag82	325-337	NANPDCKSILRALGA
HIV-1Gag28	109-123	NKSKQKTQQAADTG	HIV-1Gag83	329-341	DCKSILRALGAGATL
HIV-1Gag29	113-125	QKTQQAADTGNSSK	HIV-1Gag84	333-345	ILRALGAGATLEEMM
HIV-1Gag30	117-129	QQAADTGNSSKVS	HIV-1Gag85	337-351	LGAGATLEEMMTACQ
HIV-1Gag31	121-133	DTGNSSKVSQNYPIV	HIV-1Gag86	341-355	ATLEEMMTACQGVGG
HIV-1Gag32	125-137	SSKVSQNYPIVQNAQ	HIV-1Gag87	345-359	EMMTACQGVGGPGHK
HIV-1Gag33	129-141	SQNYPIVQNAQGMV	HIV-1Gag88	349-363	ACQGVGGPGHKARVL
HIV-1Gag34	133-145	PIVQNAQGMVHQS	HIV-1Gag89	353-367	VGGPGHKARVLAEAM
HIV-1Gag35	137-149	NAQGMVHQSLSPT	HIV-1Gag90	357-371	GHKARVLAEAMSQVQ
HIV-1Gag36	141-153	QMVHQSLSPTLNAW	HIV-1Gag91	361-375	RVLAEAMSQVQHTNI
HIV-1Gag37	145-157	QSLSPRTLNAWVKVI	HIV-1Gag92	365-379	EAMSQVQHTNIMMQR
HIV-1Gag38	149-161	PRTLNAWVKVIEEKA	HIV-1Gag93	369-383	QVQHTNIMMQRGNFR
HIV-1Gag39	153-165	NAWVKVIEEKAFSPE	HIV-1Gag94	373-387	TNIMMQRGNFRGQKR
HIV-1Gag40	157-169	KVIEEKAFSPEVIPM	HIV-1Gag95	377-391	MQRGNFRGQKRIKCF
HIV-1Gag41	161-173	EKAFSPEVIPMFSAL	HIV-1Gag96	381-395	NFRGQKRIKCFNCGK
HIV-1Gag42	165-177	SPEVIPMFSALSEGA	HIV-1Gag97	385-399	QKRIKCFNCGKEGHL
HIV-1Gag43	169-181	IPMFSALSEGATPQD	HIV-1Gag98	389-403	KCFNCGKEGHLARNC
HIV-1Gag44	173-185	SALSEGATPQDLNMM	HIV-1Gag99	393-407	CGKEGHLARNCRAPR
HIV-1Gag45	177-189	EGATPQDLNMMMLNIV	HIV-1Gag100	397-411	GHLARNCRAPRKKGC
HIV-1Gag46	181-193	PQDLNMMMLNIVGGHQ	HIV-1Gag101	401-415	RNCRAPRKKGCWKCG
HIV-1Gag47	185-197	NMMLNIVGGHQAAMQ	HIV-1Gag102	405-419	APRKKGCWKCGKEGH
HIV-1Gag48	189-201	NIVGGHQAAMQMLKD	HIV-1Gag103	409-423	KGCWKCGKEGHQMKD
HIV-1Gag49	193-205	GHQAAMQMLKDTINE	HIV-1Gag104	413-427	KCGKEGHQMKDCTER
HIV-1Gag50	197-209	AMQMLKDTINEAAE	HIV-1Gag105	417-431	EGHQMKDCTERQANF
HIV-1Gag51	201-213	LKDTINEAAEWDR	HIV-1Gag106	421-435	MKDCTERQANFLGKI
HIV-1Gag52	205-217	INEEAAEWDRLHPVH	HIV-1Gag107	425-439	TERQANFLGKIWPSS
HIV-1Gag53	209-221	AAEWDRLHPVHAGPI	HIV-1Gag108	429-443	ANFLGKIWPSSKGRP
HIV-1Gag54	213-225	DRLHPVHAGPIPPGQ	HIV-1Gag109	433-447	GKIWPSSKGRPGNFP
HIV-1Gag55	217-229	PVHAGPIPPGQMREP	HIV-1Gag110	437-451	PSSKGRPGNFPQSRP

Peptid	Position	Sequenz (C-N)	Peptid	Position	Sequenz (C-N)
HIV-1Gag111	441-455	GRPGNFPQSRPEPTA	HIV-1Gag117	465-479	EEITSPPKQEQKDRE
HIV-1Gag112	445-459	NFPQSRPEPTAPPAE	HIV-1Gag118	469-483	SPPKQEQKDREQDPP
HIV-1Gag113	449-463	SRPEPTAPPAEIFGM	HIV-1Gag119	473-487	QEQKDREQDPPSVSL
HIV-1Gag114	453-467	PTAPPAEIFGMGEEI	HIV-1Gag120	477-491	DREQDPPSVSLKSLF
HIV-1Gag115	457-471	PAEIFGMGEEITSPP	HIV-1Gag121	481-495	DPPSVSLKSLFGNDL
HIV-1Gag116	461-475	FGMGEEITSPPKQEQ	HIV-1Gag122	485-499	VSLKSLFGNDLLSQ

Anhang V: Matrixformat der Peptidpools mit den Einzelpeptiden

Peptidpools AGM _{VerV}	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
21	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
22	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
23	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
24	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
25	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
26	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
27	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
28	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
29	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
30	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

Peptidpools Mac ₂₃₉	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106
85	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
86	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
87	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
88	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
89	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
90	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
91	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
92	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
93	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
94	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
95	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121

Peptidpools HIV-1 _{HXB2}	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
63	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
64	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
65	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
66	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
67	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
68	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
69	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
70	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
71	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
72	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
73	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121

Anhang VI: 12-16mer OVA-Peptide

Peptid	Position	Sequenz (C-N)	Peptid	Position	Sequenz (C-N)
OVA1	1-15	MEFCFDVFKELKVHH	OVA44	188-203	EDTQAMPFRVTEQESK
OVA2	6-21	DVFKELKVHHANENI	OVA45	194-208	PFRVTEQESKPVQMM
OVA3	11-25	LKVHHANENIFYCPI	OVA46	199-213	EQESKPVQMMYQIGL
OVA4	16-29	ANENIFYCPIAIMSA	OVA47	204-217	PVQMMYQIGLFRVA
OVA5	21-35	FYCPIAIMSALAMVY	OVA48	208-220	MYQIGLFRVASMA
OVA6	26-39	AIMSALAMVYLGAK	OVA49	211-225	IGLFRVASMASEKMK
OVA7	30-43	ALAMVYLGAKDSTR	OVA50	216-229	VASMASEKMKILEL
OVA8	34-48	VYLGAKDSTRTQINK	OVA51	220-232	ASEKMKILELPFA
OVA9	39-52	KDSTRTQINKVVR	OVA52	223-236	KMKILELPFASGTM
OVA10	43-55	RTQINKVVRFDKL	OVA53	227-240	LELPFASGTMSMLVL
OVA11	46-59	INKVVRFDKLPGF	OVA54	231-245	ASGTMSMLVLLPDEV
OVA12	49-62	VVRFDKLPFGDS	OVA55	236-249	SMLVLLPDEVSGL
OVA13	53-63	DKLPFGDSIEA	OVA56	239-251	VLLPDEVSGLEQL
OVA14	55-70	LPGFGDSIEAQCGTSV	OVA57	242-255	PDEVSGLEQLESII
OVA15	61-73	SIEAQCGTSVNVH	OVA58	246-260	SGLEQLESIIINFEKL
OVA16	64-77	AQCGTSVNVHSSLR	OVA59	251-263	LESIINFEKLTEW
OVA17	68-80	TSVNVHSSLRDIL	OVA60	254-268	IINFEKLTEWTSNV
OVA18	71-85	NVHSSLRDILNQITK	OVA61	259-273	KLTEWTSNVMEERK
OVA19	76-90	LRDILNQITKPNVDY	OVA62	264-278	TSSNVMEERKIKVYL
OVA20	81-95	NQITKPNVDVYSFSLA	OVA63	269-283	MEERKIKVYLPRMKM
OVA21	86-100	PNDVYSFSLASRLYA	OVA64	274-297	IKVYLPRMKMEEKY
OVA22	91-104	SFSLASRLYAEERY	OVA65	278-292	LPRMKMEEKYNLTSV
OVA23	95-107	ASRLYAEERYPIL	OVA66	283-296	MEEKYNLTSVLMAM
OVA24	98-111	LYAEERYPILPEYL	OVA67	287-301	YNLTSVLMAMGITDV
OVA25	102-115	ERYPILPEYLQCVK	OVA68	292-306	VLMAMGITDVFSSA
OVA26	106-119	ILPEYLQCVKELYR	OVA69	297-311	GITDVFSSANLSGI
OVA27	110-122	YLQCVKELYRGGL	OVA70	302-314	FSSANLSGISSA
OVA28	113-127	CVKELYRGGLEPINF	OVA71	305-319	SANLSGISSAESLKI
OVA29	118-131	YRGGLEPINFQTAA	OVA72	310-324	GISSAESLKISQAVH
OVA30	122-135	LEPINFQTAADQAR	OVA73	315-328	ESLKISQAVHAAHA
OVA31	126-138	NFQTAADQARELI	OVA74	319-333	ISQAVHAAHAEINEA
OVA32	129-142	TAADQARELINSWV	OVA75	324-339	HAAHAEINEAGREVV
OVA33	132-146	DQARELINSWVESQT	OVA76	329-343	EINEAGREVVGSAEA
OVA34	137-151	LINSWVESQTNGIIR	OVA77	334-348	GREVVGSAEAGVDAA
OVA35	142-154	VESQTNGIIRNVL	OVA78	339-350	GSAEAGVDAASV
OVA36	147-162	SQTNGIIRNVLPSSV	OVA79	341-355	AEAGVDAASVSEEFR
OVA37	153-167	IRNVLPSSVDSQTA	OVA80	346-360	DAASVSEEFRAHPF
OVA38	157-171	LQPSSVDSQTAMVLV	OVA81	351-365	SEEFRAHPFLFCIK
OVA39	162-176	VDSQTAMVLVNAIVF	OVA82	356-368	ADHPFLFCIKHIA
OVA40	167-180	AMVLVNAIVFKGLW	OVA83	359-373	PFLFCIKHIATNAVL
OVA41	171-185	VNAIVFKGLWEKTFK	OVA84	364-377	IKHIATNAVLFGR
OVA42	176-192	FKGLWEKTFKDEDTQA	OVA85	368-381	ATNAVLFGRGCVSP
OVA43	183-197	KTFKDEDTQAMPFRV			

Alignment der SIVagm3gag Sequenzvarianten wildtype, theoretische codonoptimiert und tatsächliche Sequenz im pTH-Vektor

[illegible]

[illegible]

Varianzen zur wildtyp Sequenz

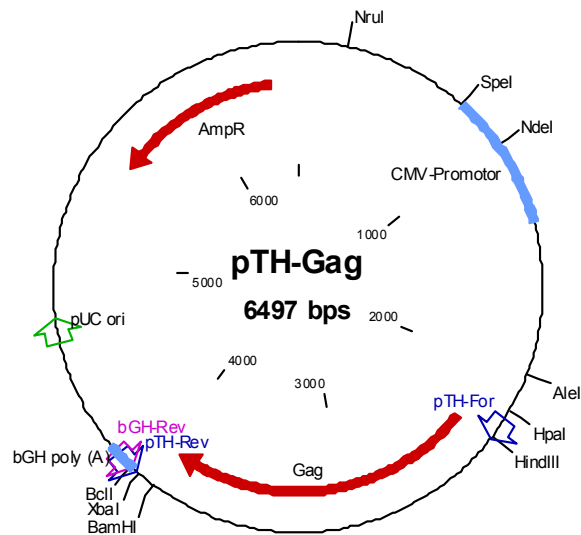
Alignment der SIVmac239gag Sequenzvarianten wildtype, theoretische codonoptimiert und tatsächliche Sequenz im pTH-Vektor

[illegible]

Varianzen zur wildtyp Sequenz

Anhang IX: Vektorkarte

pTH-Vektor nach Hanke et. al (1998):



Anhang X: Lage der kartierten MHC-Epitope

SIVagmGag (Accession M30931):

MGAATSALNRRQLDKFEHRLRLPTGKKKQIKHLIWAGKEMERFGLHERLLESEEGCKKIIEVLYPLE
 PTGSEGLKSLFNLVCVLFVHRDKEVKDTEEAVALVRQCCHLVEKERNARNTTETSSGQKNDKGV
 VPPGGSONFPAQQQGNAMHIVPLSPRTLNAWVKAVERKKFGAEIVPMFQALSEGCTPYDINQMLNVLG
 DHQALQIVKEIINEEAAQWDIAHPPAGPLPAGQLRDRGSDIAGTTSTVQEQLEWIYTANPRVDVG
 H-2^d H-2^d AGM10 AGM11 H-2^b
 AIYFRWIIIGLQKCVKMYNEVSVLDIRQGPKEAFKDYDRFYKATRAEQASGEVQWMTESLLIQNAN
 PDCKVILKGLGMHPTLEEMLTACQGVGGPSYKAKVMAEMMQNMQSQNMQGGQGRPRPPVKCYNCG
 KFGHMQRQCPEPRKMRCLKCGKPGHLAKDCRGQVNFGLGYGRWMGAKPRNFPAATLGVEPTAPPPSPY
 DPAKKLLQQYADKGKQLREQRKKPPAVNPDWTEGYSLNSLFGEDQ

SIVmacGag (Accession M33262):

MGVNRNSVLSGKKADELEKIRLRPNNGKKKMYMLKHVVMAANELDRFGLAESLLENKEGCQKILSVLAPLV
 Rh19
 ETGSENLSLYNTVCVIMCIHAEKVKHTEEAQIVQRHLVVETGTTETMPKTSRPTAPSSGRGGNYF
 Rh13/15
 VQQIGGNYVHLPLSPRTLNAWVKLIEKKFGAEVVPFGFQALSEGCTPYDINQMLNCVGDHQAAMQIIR
 DIINEEAADWDLQHPQAPQQGQLREPSGSDIAGTTSSVDEQIQWMYRQQNPIPVGNIYRRWIQLGLQ
 Rh17 H-2^b Rh14
 KCVRMYNPTNILDVKQGPKEPFQSYVDRFYKSLRAEQTDAAVKNWMTQTLLIQNANPDCKLVLKGLGV
 Rh18 Rh20
 NPTLEEMLTACQGVGGPGQKARLMAEALKEALAPVPIFAAAQQRGPRKPIKCNCGKEGHSARQCRA
 PRRQGCWKCCKMDHVMACPDQRQAGFLGLGPWGKKPRNFPMQVHQGLMPTAPPEDPAVDLLKNYMQI
 GKQQREKQRESREKPYKEVTEDLLHLNSLFGGDQ

 Kartierte Epitope der Mäusestämme H-2^b und H-2^d

 Kartierte Epitope der Primaten

Publikationsliste

Die aus dieser Dissertation entstehenden Publikationen sind in Vorbereitung, jedoch bis jetzt weder eingereicht noch veröffentlicht.

Christine Siegismund

Eidesstattliche Erklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Robert Koch-Institut, Berlin in der Zeit vom 01. Mai 2004 bis zum 30. April 2008 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig erarbeitet und verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Hilfen verwendet habe. Ich habe mich weder bereits um einen Doktorgrad beworben noch bin ich im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades. Des Weiteren verfüge ich über Kenntnis der Promotionsordnung, die dem angestrebten Verfahren zugrunde liegt.

Berlin, den 30. April 2008

Christine Siegismund